



Universidad Pablo de Olavide  
Facultad de Ciencias Experimentales  
Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular

Cristina Calvino Núñez

**Efecto de la dosis fisiológica de noradrenalina sobre la  
maduración postnatal del sistema respiratorio y el  
desarrollo postnatal de la conducta cognitiva y motora en  
ratones. Caracterización del mutante EAR2 adulto.**

Tesis Doctoral dirigida por  
Eduardo Domínguez del Toro

Sevilla, 2013



Don Eduardo Domínguez del toro, profesor titular del Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad Pablo de Olavide:

CERTIFICA:

que el presente trabajo titulado **“Efecto de la dosis fisiológica de noradrenalina sobre la maduración postnatal del sistema respiratorio y el desarrollo postnatal de la conducta cognitiva y motora en ratones. Caracterización del mutante EAR2 adulto”** ha sido realizado bajo su dirección y supervisión por Dña. Cristina Calvino Núñez, Licenciada en Ciencias Ambientales por la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, y considera que reúne las condiciones de calidad y rigor científico para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Sevilla, ..... de ..... de 2013.

Fdo.: Eduardo Domínguez del Toro



*A mi abuela Francisca, que entre cola caos, serranitos  
y miles de besos y achuchones  
me enseñó lo que importa en esta vida.*

*A mis padres, que como el yin y el yan  
me hacen encontrar el equilibrio de los polos opuestos.  
Porque aunque pasen los años, siempre seré vuestra niña.*

*A mis hermanos, que juntos formamos parte de un todo,  
sin saber dónde empieza y acaba cada uno de nosotros.  
Pronto alcanzaremos nuestro lugar.  
A Milo, el cuarto Calvinito.  
Porque siempre serás uno de los nuestros.*

*A Miguel, mi amigo, mi apoyo incondicional,  
mi compañero de la vida.  
Porque el casi sigue estando ahí para nosotros.*

*A mis amigos, que me hacen sentir que encajo en este mundo  
con una sola tarde de charla y risas. A mis pequeños tigres chulis.  
Porque aunque acabemos cada uno en una parte del mundo,  
los kilómetros no pasarán por nosotros, siendo los de siempre, los del primer día.  
A Almudena y Arturo, porque sabéis que siempre seréis mis ojitos derechos.  
A Juan Carlos, que lo está siendo también.*

*A mis compañeros de laboratorio. Siempre habéis estado ahí cuando os he necesitado  
y cuando no, también.  
Me habéis alegrado estos cuatro años, haciéndome sentir que somos una familia.  
José Antonio, Ale, Iván, Miriam, María E.,  
porque las comidas con vosotros han sido el momento más esperado del día  
y espero que se sigan repitiendo a lo largo de los años.  
A Raudel, que siempre me guía allá por dónde voy,  
acompañado de una sonrisa y una caipiriña.  
A mis pequeñas, Maritere y Noelita, porque siempre habéis estado ahí.  
Y de verdad. Guiándome y apoyándome día a día. Sabéis que os llevo muy dentro.*

*A Agnès, que con sus clases y sus curiosidades,  
me metió el gusanillo de la investigación.*

*A Eduardo, por darme la oportunidad de realizar la tesis,  
confiando en mí y enseñándome todo lo que soy capaz de hacer por mí misma.*

*A Fani, Mari, Pepelu, Anabel, Cuqui, M<sup>a</sup> José, Rocío,  
porque esta tesis es en parte vuestra también.*

*Y a los que no estáis nombrados,  
pero siempre estáis ahí,  
haciéndome sentir tanto en estos años.*

Esta tesis ha sido realizada gracias al programa I3 de la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla. Y al proyecto de Investigación BFU2011-29089, denominado “Generación y almacenamiento de respuestas motoras aprendidas en estructuras corticales de ratones y ratas silvestres o manipulados genéticamente”, proyecto incluido en el Plan Nacional de Investigación del Ministerio de Economía y Competitividad, de José María Delgado.

*Lo que no me mata me hace más fuerte*

*Friedrich Wilhelm Nietzsche (1844-1900)*





## RESUMEN

Durante el desarrollo del sistema nervioso, la época perinatal, espacio de tiempo comprendido entre el final de la gestación y el periodo de lactancia en el mamífero, resulta especialmente delicada. La administración de fármacos o medicamentos diversos, así como el estado de estrés en la madre pueden repercutir en las conexiones que aún se están formando en el cerebro de su cría. En los modelos animales de experimentación, como en humanos, los recién nacidos son bastante inmaduros, por ello son frecuentes los estudios realizados en roedores (ratas y ratones), para ver los efectos de diversas actuaciones en el sistema nervioso y después extrapolarlo a los humanos (Mirmiran, 1985).

Muchos de los factores descritos pueden actuar sobre sistemas de neurotransmisores cerebrales, sistemas endocrinos y estados comportamentales, afectando a procesos como la neurogénesis, relaciones con factores tróficos o síntesis de ADN, e induciendo suaves cambios cuando son usados durante el periodo de rápido crecimiento del cerebro, como es el periodo perinatal (Mirmiran y Swaab, 1987). Especialmente importantes son las consecuencias neurológicas que deriven de tales situaciones, pues en un principio pueden pasar inadvertidas.

Los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos se sobreexpresan momentáneamente en zonas proliferativas en el cerebro en desarrollo. Tanto su estimulación (Gorter y cols 1990) como su bloqueo (Soto-Moyano y cols 1991) durante este periodo alteran el desarrollo de circuitos neuronales, la conectividad sináptica y las respuestas neuronales incluso llegan a afectar a motoras y cognitivas en el adulto (Shishkina y cols., 2001).

El objeto general de nuestro trabajo ha consistido en reafirmar la importancia de la maduración del sistema alfa-adrenérgico, evaluando los efectos comportamentales y cognitivos en neonatos, durante su desarrollo postnatal temprano, tras la administración de distintos fármacos (clonidina y ácido retinoico) y con la reducción de neuronas del Locus coeruleus (mutante EAR2). Para este mutante EAR2, se hizo un seguimiento del ratón adulto, estudiándose la relación entre la reducción de noradrenalina y sus efectos en el comportamiento, dolor y memoria y aprendizaje. Se desprende de nuestro estudio que los ratones con el sistema noradrenérgico afectado, presentan un retraso generalizado en el desarrollo psicomotor postnatal y adulto.



## *ÍNDICE*



<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. SISTEMA RESPIRATORIO .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. SISTEMA ADRENÉRGICO .....</b>	<b>10</b>
1.2.1. Catecolaminas .....	11
1.2.2. Receptores adrenérgicos .....	12
1.2.3. Vías noradrenérgicas. Locus coeruleus .....	14
1.2.3.1. Trastornos neurológicos y psiquiátricos .....	20
<b>1.3. RELACIÓN DEL GENERADOR DEL RITMO RESPIRATORIO Y EL LOCUS COERULEUS ....</b>	<b>21</b>
<b>1.4. DESARROLLO EMBRIONARIO DEL TRONCO DEL ENCÉFALO .....</b>	<b>23</b>
1.4.1. Efectos del ácido retinoico en la estructuración del tronco del encéfalo .....	25
1.4.2. Papel del receptor nuclear EAR2 en el desarrollo de las neuronas del Locus coeruleus ..	27
<b>1.5. DESARROLLO POSTNATAL DEL SISTEMA NORADRENÉRGICO .....</b>	<b>30</b>
1.5.1. Clonidina .....	30
<b>1.6. APRENDIZAJE Y MEMORIA .....</b>	<b>33</b>
1.6.1. Aprendizaje asociativo .....	34
1.6.2. Condicionamiento instrumental u operante .....	36
1.6.3. Memoria a corto y largo plazo .....	38
<b>1.7. NOCICEPCIÓN .....</b>	<b>40</b>
 <b>2. OBJETIVOS .....</b>	 <b>45</b>
 <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	 <b>47</b>
<b>3.1. SUJETOS EXPERIMENTALES .....</b>	<b>49</b>
3.1.1. Sujetos recién nacidos .....	49
3.1.2. Sujetos adultos .....	50
<b>3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>51</b>
3.2.1. Estudio de la actividad respiratoria .....	51
3.2.2. Batería de Fox .....	54
3.2.2.1. Marcadores de desarrollo .....	54
3.2.2.2. Reflejo de succión .....	55
3.2.2.3. Estimulación de las vibrisas .....	55
3.2.2.4. Estimulación de las orejas .....	55
3.2.2.5. Reflejo de giro .....	56
3.2.2.6. Vértigo .....	56
3.2.2.7. Geotaxia negativa .....	57
3.2.2.8. Respuesta de sobresalto (startle) .....	57
3.2.2.9. Suspensión .....	58
3.2.3. Pruebas de comportamiento motor .....	59
3.2.3.1. Actímetro o campo abierto .....	59
3.2.3.2. Cilindro rotatorio o Rotarod .....	60
3.2.4. Memoria y aprendizaje .....	61
3.2.4.1. Evitación pasiva .....	61
3.2.4.2. Inhibición por prepulso (IPP) .....	62
3.2.4.3. Condicionamiento operante: la jaula de Skinner .....	65
3.2.4.4. Reconocimiento de objetos .....	69
3.2.5. Prueba de la placa caliente .....	72
<b>3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>74</b>
 <b>4. RESULTADOS .....</b>	 <b>75</b>

<b>4.1. ESTUDIO DE LA INTERVENCIÓN DEL SISTEMA ADRENÉRGINO EN LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA POSTNATAL.....</b>	<b>77</b>
<b>4.2. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA ADRENÉRGINO EN EL DESARROLLO POSTNATAL: BATERÍA DE FOX.....</b>	<b>83</b>
4.2.1. Primer día de realización de las pruebas y aparición de marcadores de desarrollo.....	83
4.2.2. Control del peso y reflejo de succión.....	87
4.2.3. Evolución del sistema vestibular.....	89
4.2.4. Estudio de la fuerza muscular.....	92
<b>4.3. INTERVENCIÓN DEL SISTEMA ADRENÉRGINO EN LA ACTIVIDAD EXPLORATORIA POSTNATAL.....</b>	<b>93</b>
<b>4.4. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DEL SISTEMA ADRENÉRGINO Y LA MEMORIA POSTNATAL..</b>	<b>96</b>
<b>4.5. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL SISTEMA ADRENÉRGINO EN LA ANALGESIA POSTNATAL.....</b>	<b>97</b>
<b>4.6. PARTICIPACIÓN DEL LOCUS COERULEUS EN EL APRENDIZAJE MOTOR DEL MUTANTE EAR2 ADULTO.....</b>	<b>99</b>
4.6.1. Prueba del campo abierto.....	99
4.6.2. Prueba del Rotarod o cilindro rotatorio.....	100
<b>4.7. CURSO TEMPORAL DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA EN EL MUTANTE EAR2 ADULTO.....</b>	<b>102</b>
4.7.1. Prueba de la evitación pasiva.....	102
4.7.2. Prueba de la inhibición por prepulso.....	104
4.7.3. Condicionamiento operante: la jaula de Skinner.....	107
4.7.4. Prueba del reconocimiento de objetos.....	108
<b>4.8. INTERVENCIÓN DEL LOCUS COERULEUS EN LA ANALGESIA DEL MUTANTE ADULTO EAR2.....</b>	<b>111</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>113</b>
<b>5.1. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA NORADRENÉRGINO EN LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA POSTNATAL.....</b>	<b>116</b>
5.1.1. La reducción de noradrenalina en el sistema noradrenérGINO afecta al control de la actividad respiratoria postnatal.....	116
5.1.2. La reducción de noradrenalina por el tratamiento postnatal con clonidina y por la mutación EAR2 provoca un mayor número de episodios de hiperpnea.....	118
<b>5.2. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA NORADRENÉRGINO EN EL DESARROLLO POSTNATAL.....</b>	<b>120</b>
5.2.1. El sistema noradrenérGINO central no participa en el desarrollo de los marcadores de desarrollo postnatal, pero sí se ve afectado por el tratamiento con ácido retinoico.....	120
5.2.2. Las distintas modificaciones realizadas en el sistema noradrenérGINO afectan al desarrollo del reflejo de succión.....	122
5.2.3. La disminución de la transmisión noradrenérGINA por la administración postnatal de clonidina y la eliminación de neuronas del Locus coeruleus en el mutante EAR2 produce un retraso en el desarrollo del sistema vestibular.....	123
5.2.4. La reducción de la transmisión noradrenérGINA debido a la administración de clonidina y a la eliminación de neuronas del Locus coeruleus aumenta la latencia de suspensión de los ratones neonatos.....	125
<b>5.3. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA NORADRENÉRGINO EN LA ACTIVIDAD EXPLORATORIA..</b>	<b>126</b>
5.3.1. Las distintas alteraciones producidas en el sistema noradrenérGINO afectan a la actividad exploratoria de los ratones neonatos.....	126
5.3.2. La mutación EAR2 perjudica el aprendizaje motor y la coordinación del ratón adulto.....	128
<b>5.4. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA NORADRENÉRGINO EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.....</b>	<b>129</b>
5.4.1. Las distintas alteraciones provocadas en el sistema noradrenérGINO provocan una	

---

reducción en la exploración de los objetos novedosos.....	129
5.4.2. La mutación EAR2 impide el aprendizaje con un estímulo aversivo en ratones adultos.....	131
5.4.3. Respuestas reflejas auditivas en el mutante EAR2 adulto.....	132
5.4.4. La reducción de neuronas del Locus coeruleus en el mutante EAR2 dificulta el aprendizaje instrumental en el ratón adulto.....	133
<b>5.5. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL SISTEMA ADRENÉRGICO EN LA ANALGESIA.....</b>	<b>135</b>
 <b>6. CONCLUSIONES .....</b>	 <b>139</b>
 <b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	 <b>143</b>





## ***1. INTRODUCCIÓN***



## 1.1. SISTEMA RESPIRATORIO

La respiración es una función vital del organismo. Sin embargo, ésta no siempre es un proceso regular y rítmico, ya que está adaptándose continuamente a las necesidades del organismo, para aportar el oxígeno necesario al metabolismo celular y eliminar el dióxido de carbono producido durante el mismo.

Existen dos centros nerviosos que regulan la respiración: i) el centro de control voluntario, localizado en la corteza (vías corticoespinal); y ii) el centro automático, situado en la protuberancia y en el bulbo raquídeo, ambos en el tronco del encéfalo (fascículos corticoespinal lateral y ventral).

La corteza cerebral caracteriza la respiración voluntaria. Modifica la actividad de los centros bulbares y constituye la actividad voluntaria de la respiración, induciendo la hiperventilación o la hipoventilación. La corteza también coordina la actividad contráctil alternada de los músculos inspiratorios y espiratorios para que actúen coordinadamente. También se controla la respiración en situaciones fisiológicas como la defecación o en la emisión de sonidos a la hora de comunicarse entre individuos. El sistema límbico y el hipotálamo influyen sobre el tipo de respiración que se presenta en situaciones de ira o miedo.

La respiración rítmica basal, o eupnea, está regulada por los centros respiratorios nerviosos situados en el tronco del encéfalo que recogen información proveniente del aparato respiratorio y de otras partes del organismo, para dar lugar a una respuesta a través de los órganos efectores o musculatura respiratoria que determinará la profundidad de la respiración, o volumen corriente, y la frecuencia. Estos centros pueden dividirse en tres grupos localizados en dos regiones distintas del tronco del encéfalo:

A nivel de puente (protuberancia) en el tercio superior, se encuentra el grupo respiratorio pontino; compuesto por el complejo Parabraquial/Kölliker-Fuse, que se corresponde con el centro neumotáxico. Activa la espiración rítmica inhibiendo o interrumpiendo la inspiración, controlando el volumen inspiratorio y la frecuencia respiratoria. En el tercio inferior se encuentra el núcleo parabraquial, que es el encargado de mandar información hasta el hipotálamo, la amígdala y otras estructuras suprapontinas. Es el llamado centro apnéustico. Éste estimula el grupo respiratorio dorsal

o centro inspiratorio bulbar, e induce una inspiración prolongada o apneusis. En condiciones de respiración normal, este centro se encuentra inhibido por el centro neumotáxico. Por lo que en resumen, el puente permite alternar de inspiración a espiración.

A nivel de Bulbo raquídeo se localizan el Grupo Respiratorio Ventral (GRV) y el Grupo Respiratorio Dorsal (GRD).

El GRV está ubicado en la parte ventrolateral y en él se incluyen el complejo Botzinger (en la parte más rostral) y el complejo Pre- Botzinger, que juega un papel muy importante como marcapasos. Las neuronas localizadas en dichos núcleos generan patrones de actividad dentro de una red neuronal, cuya salida efectiva coincide con el patrón rítmico respiratorio. Luego aquí se controla la ritmicidad de la respiración. El GRV también interviene en la respiración activa (voluntaria o forzada).

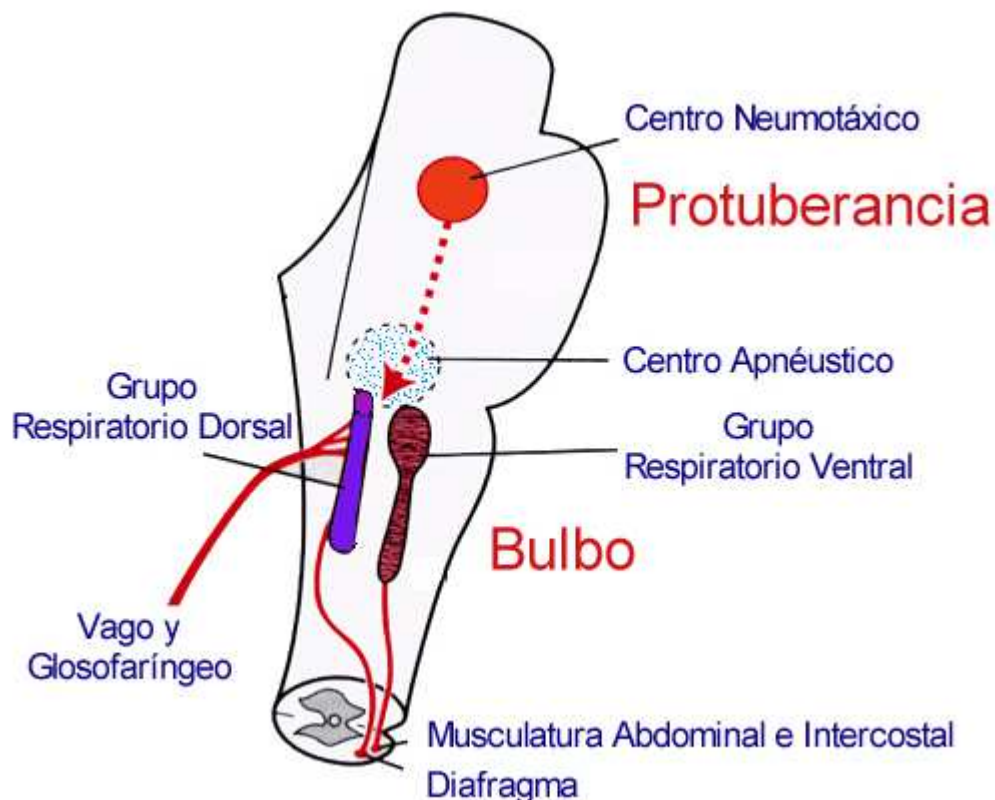
El GRD se ubica en el núcleo del fascículo solitario (NTS). Existen aferencias sobre él que llegan desde los quimiorreceptores y barorreceptores así como de los receptores cardíacos y barorreceptores arteriales por lo que se considera este grupo como la primera estación para procesar e integrar reflejos respiratorios. (Revisado en Neurología Argentina, 2011). El GRD controla el ritmo y la frecuencia respiratoria.

Estos tres grupos de neuronas son los responsables del control nervioso de la respiración.

Un estudio in vitro con una preparación de troncoencéfalo aislado realizado por Morin-Surun y cols. (1992), muestra la existencia de un Generador del Ritmo Respiratorio localizado entre el bulbo raquídeo y el puente que es el encargado de la actividad rítmica respiratoria. La génesis del ritmo básico de la respiración se basa en la actividad alternada de los centros bulbares inspiratorios y espiratorios, que constituyen el generador central del ritmo respiratorio. Estas neuronas constan de actividad espontánea y rítmica. Es la parte involuntaria de la respiración.

Las vías descendentes parten desde el GRV, NTS y el centro neumotáxico (complejo parabraquial/Kolliker–Fuse) hasta la medula espinal y de ahí hacia las neuronas frénicas intercostales y los músculos abdominales. (Revisado en Nogués y Benarroch, 2008).

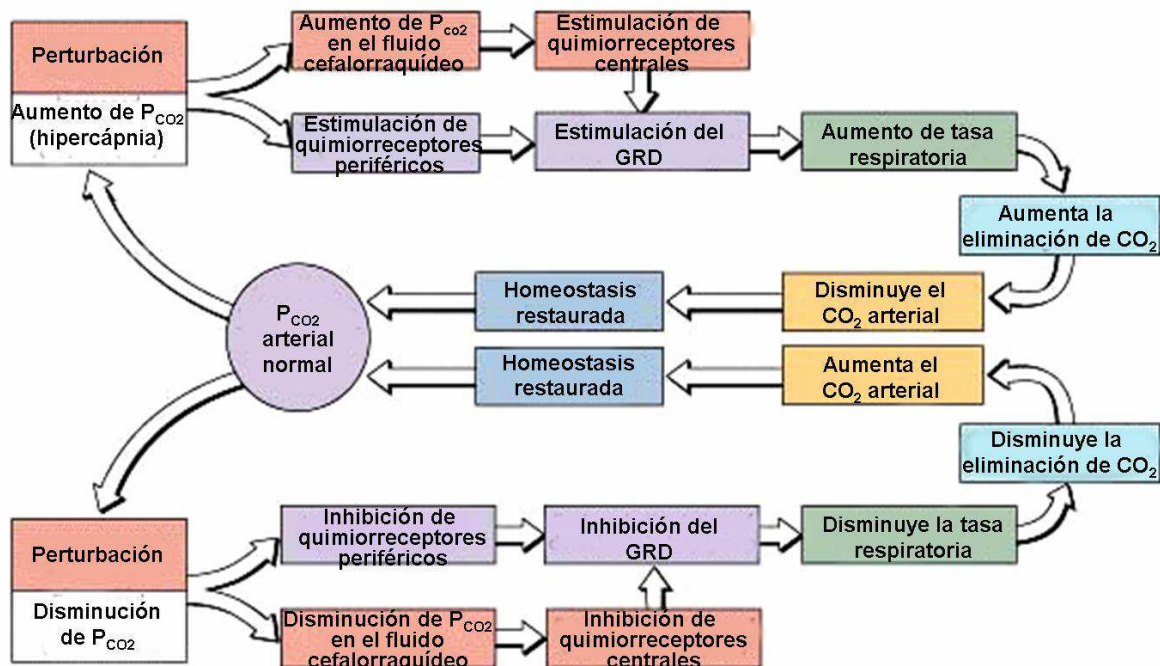
En condiciones de respiración basal o de reposo, la actividad inspiratoria se genera automáticamente, produciendo la contracción del diafragma. Después esta actividad se detiene, lo que ocasionará la relajación del diafragma y la espiración, tras los cuales volverán a descargar de nuevo. En esta situación, la actividad espiratoria está inhibida y la espiración ocurre de manera pasiva. Durante el ejercicio o ante necesidades que requieran mayor intensidad y frecuencia ventilatoria, se incrementará la actividad de las neuronas inspiratorias, provocando la contracción de los músculos inspiratorios accesorios, pero también activando a las neuronas espiratorias, que inducirá la contracción de la musculatura espiratoria accesorio.



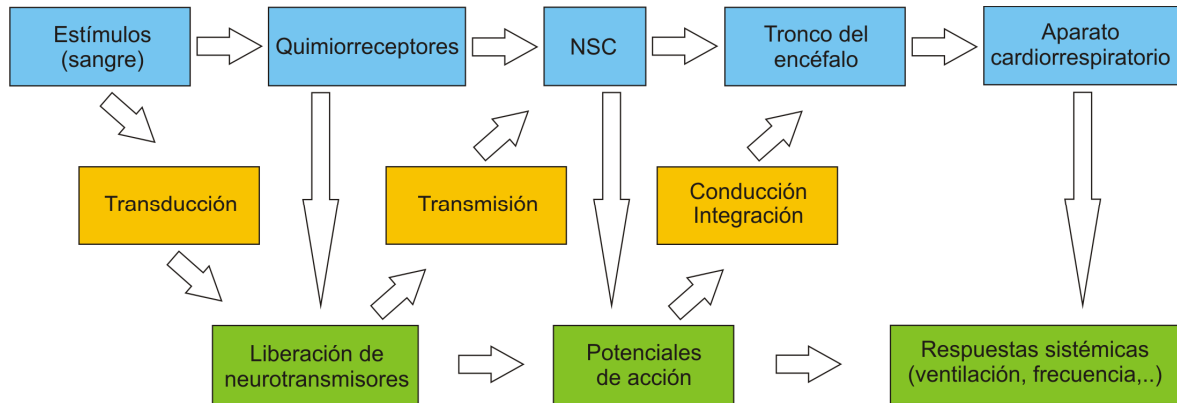
**Figura 1.1. Estructuras relacionadas con la respiración.** A nivel del puente (protuberancia), se encuentra el complejo parabraquial/ Kölliker- Fuse o también llamado centro neumotáxico, representado en la imagen con un círculo de color rojo. En el puente también encontramos el núcleo parabraquial (centro apnéustico) que manda información a la amígdala, el hipotálamo y otras estructuras suprapontinas. A nivel del bulbo raquídeo (médula oblonga), encontramos el grupo respiratorio ventral (GRV) en la parte ventrolateral. En este núcleo se puede distinguir el complejo Bötzing en la zona más rostral y el complejo Pre-Bötzing en la parte más ventral. En el núcleo del fascículo solitario, se encuentra el grupo respiratorio dorsal (GRD), el cual es la primera estación para procesar e integrar los reflejos respiratorios.

Como se ha mencionado anteriormente, el grupo respiratorio dorsal (GRD) recibe aferencias de quimiorreceptores con los que se controla la concentración de  $\text{CO}_2$  en

sangre, para regular el ritmo respiratorio. Los quimiorreceptores internos nos avisan de variaciones en las presiones de gases y pH sanguíneos. Su activación da lugar a respuestas reflejas homeostáticas encaminadas a mantener el equilibrio en el medio interno y así continuar con el funcionamiento normal de todas las células (figura 1.2).



**Figura 1.2. Representación del control respiratorio a nivel de quimiorreceptores.** Esquema del control respiratorio ante un aumento de la presión parcial de dióxido de carbono en la parte superior de la imagen (hipercapnia: pH bajo, similar a la hipoxia). En la parte inferior se muestra el mismo control, pero ante una disminución de la presión parcial de dióxido de carbono (hipocapnia: aumento de la presión parcial de oxígeno, hiperoxia, pH más alto). Nótese como la presión  $CO_2$  y el pH son las principales influencias sobre la ventilación. Un retrocontrol negativo muy preciso regula estas variables.



**Figura 1.3. Estructuras, quimiorreceptores y respuestas respiratorias.** Esquema que muestra en la fila superior, coloreadas en azul, las estructuras involucradas en la función de los quimiorreceptores. En la inferior, en color verde, se presentan las respuestas habitualmente medidas en estas estructuras. En el centro se muestran, en naranja, los procesos o mecanismos por los que las estructuras generan las respuestas. (NSC, nervio del seno carotídeo).

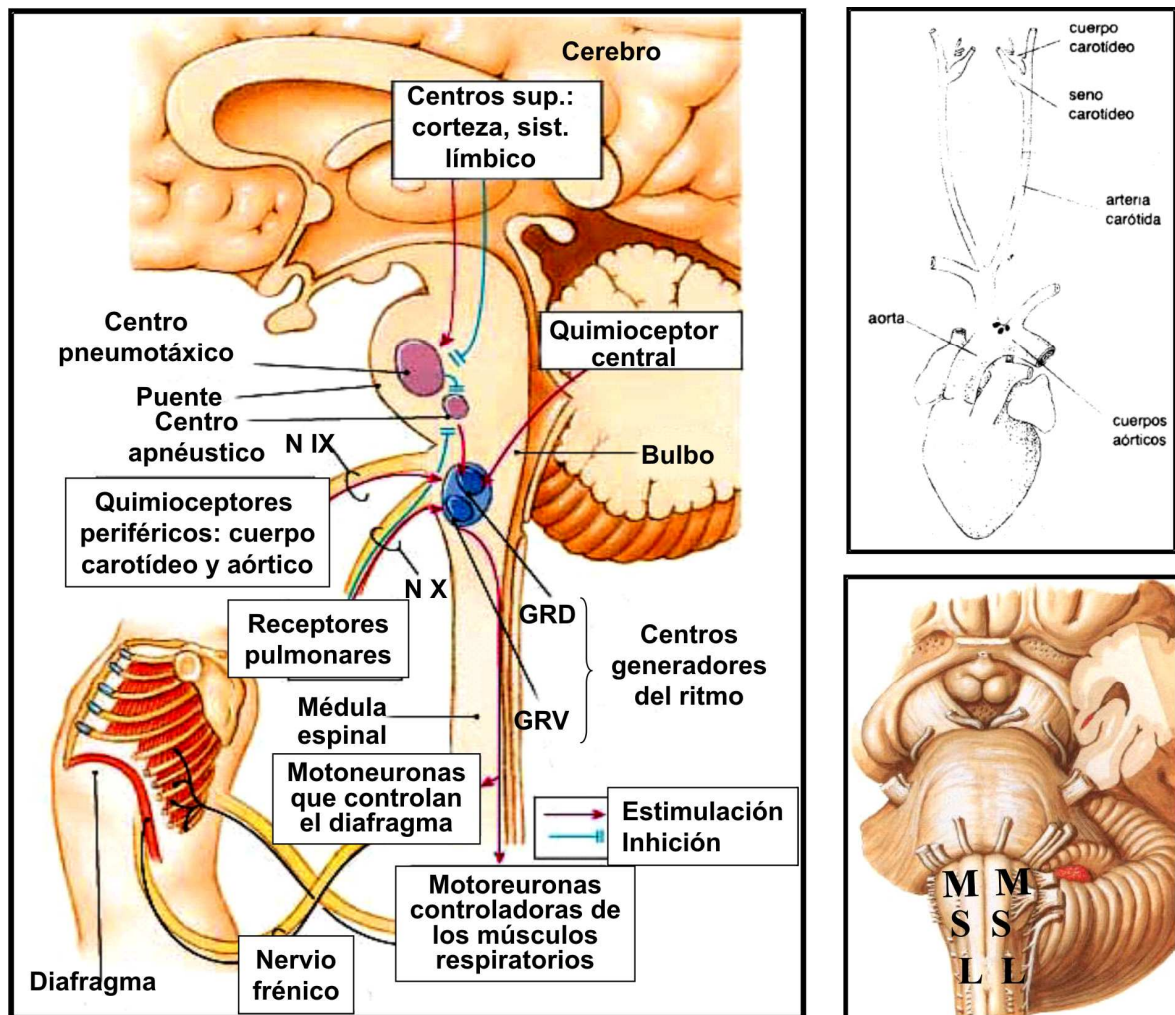
Los quimiorreceptores se clasifican en centrales y arteriales.

Dentro de los arteriales o periféricos tenemos el cuerpo carotídeo y los cuerpos aórticos. El cuerpo carotídeo es un órgano par pequeño y situado en una de las ramas de la arteria carótida, cerca de su bifurcación. Está organizado en islotes celulares separados por tejido conectivo y formado por dos tipos celulares, las células quimiorreceptoras o de tipo I y células sustentaculares o tipo II. Las células de tipo I son más numerosas y están rodeadas por las de tipo II. El cuerpo carotídeo es un órgano muy vascularizado, los capilares establecen una relación estrecha con los islotes celulares. Una parte de las fibras sensoriales del nervio del seno carotídeo penetra en el cuerpo carotídeo y hacen sinapsis con las células quimiorreceptores. Estas fibras son fibras quimiorreceptoras. Esta organización permite que las células próximas a los capilares puedan detectar rápidamente cualquier variación en las presiones arteriales de oxígeno, dióxido de carbono y pH, liberando neurotransmisores y generando cambios en la frecuencia de los potenciales de acción en las fibras quimiorreceptoras del nervio del seno carotídeo. Así, excitan las neuronas respiratorias del tronco cerebral a través del Núcleo del tracto solitario (NTS). Las variaciones de flujo sanguíneo del cuerpo carotídeo modifican la presentación del estímulo a las células quimiorreceptoras y por tanto su respuesta.

Dentro de los quimiorreceptores arteriales tenemos también los cuerpos aórticos. Éstos están localizados en la cara inferior del cayado aórtico y su organización estructural es similar a la de los cuerpos carotídeos, aunque su flujo sanguíneo es mucho menor. La inervación sensorial se hace por el nervio aórtico, rama del nervio vago.

Los quimiorreceptores centrales se encuentran en el bulbo raquídeo y no están identificados desde el punto de vista celular a día de hoy. Sin embargo, las aplicaciones locales de ácido en la superficie ventral del bulbo raquídeo permiten definir áreas con especial quimiosensibilidad al ácido, definidas éstas por su capacidad para producir hiperventilación. Estas áreas son conocidas por quimiorreceptores centrales. Se localizan tres zonas, y cada una de ellas lleva el nombre de la inicial de su descubridor (la zona más superior corresponde con el área M (Mitchell); la intermedia con el área S (Schaefer); y la inferior con el área L (Loeschke) (Figura 1.4).





**Figura 1.4. Quimiorreceptores y estructuras relacionadas con la respiración.** A la izquierda se representa un esquema general de las distintas estructuras relacionadas con la respiración y la localización de los quimiorreceptores centrales y periféricos, siendo éstos los que ejercen el control químico sobre la respiración. A la derecha, en la imagen superior se muestra una ilustración con más detalle de la localización de los quimiorreceptores arteriales o periféricos. Así, se puede observar los cuerpos carotídeos, cercanos a los senos carotídeos. Esta organización permite a las células próximas a los capilares poder detectar rápidamente cualquier variación en las presiones arteriales de oxígeno, dióxido de carbono y pH, liberando neurotransmisores y generando cambios en la frecuencia de los potenciales de acción en las fibras quimiorreceptoras del nervio del seno carotídeo. En la imagen inferior de la izquierda se muestran los quimiorreceptores centrales. Nótese como las distintas áreas diferenciadas son conocidas por el nombre de su descubridor (la zona más superior corresponde con el área M (Mitchell); la intermedia con el área S (Schaefer); y la inferior con el área L (Loeschke)).

Tras varios experimentos se ha visto que las células quimiorreceptoras liberan acetilcolina y también dopamina, esta última inducida por la baja presión de oxígeno y por canales de calcio dependientes de voltaje.

La cantidad de dopamina liberada es proporcional a la intensidad de la estimulación y a la frecuencia de descargas en el nervio del seno carotídeo. Los datos

farmacológicos indican que las células quimiorreceptoras poseen receptores para la mayoría de los neurotransmisores presentes en el cuerpo carotídeo. El hecho de que los bloqueantes de los neurotransmisores modulen la liberación de dopamina indica que estos neurotransmisores son liberados en cantidades suficientes como para regular la función de las células quimiorreceptoras.

Como nota final, cabe destacar que en la región del puente, en la parte dorsolateral, se encuentran dos grupos densos de neuronas noradrenérgicas. Estos núcleos de neuronas son el Locus subcoeruleus (A5) y el Locus Coeruleus (A6) que, entre otras cosas, se encargan de modular la respiración, con un papel fundamental durante el desarrollo postnatal (Hilaire, 2004). Es por ello necesario abordar el estudio del sistema noradrenérgico.

## **1.2. SISTEMA ADRENÉRGICO**

Llamado de esta manera debido a que las neuronas postganglionares del sistema nervioso autónomo simpático (SNAS) liberan principalmente adrenalina como neurotransmisor u hormona.

La división adrenérgica es la encargada de estimular y movilizar las reservas de energía, y es la parte que se activa en situaciones de estrés. También estimula a las glándulas suprarrenales segregándose adrenalina y noradrenalina al torrente circulatorio.

Sin embargo, aunque la adrenalina puede funcionar como neurotransmisor, su papel en el funcionamiento del sistema nervioso central queda completamente relegado por la acción de la noradrenalina. Esta paradoja en el nombre se debe a que la potente producción de adrenalina desde la médula de las glándulas suprarrenales, como consecuencia de la activación simpática, tiene unas consecuencias generalizadas e iguales que las de la acción de la noradrenalina liberada por la neurona postsináptica de una vía autónoma.

### 1.2.1. Catecolaminas

La dopamina, la noradrenalina y la adrenalina pertenecen al grupo de los neurotransmisores denominados catecolaminas. Las catecolaminas, secretadas por el sistema nervioso simpático y la médula suprarrenal, participan en la regulación de diversas funciones, en particular para integrar las reacciones a diversos tipos de estrés o tensión, que de otra manera pondrían en peligro los mecanismos homeostáticos (Goodman y col., 1996).

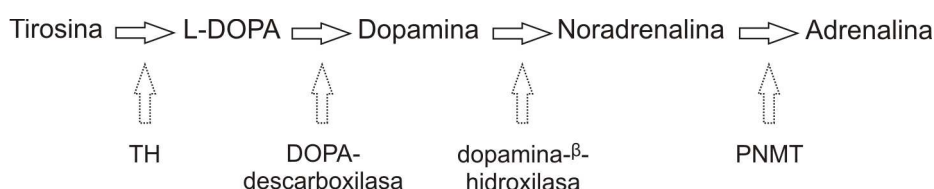
Hay mecanismos reguladores que operan eficientemente para modular la proporción de síntesis de catecolaminas. El factor limitante es la síntesis de DOPA por la *Tirosina hidroxilasa* (TH), primera enzima que participa en la ruta de síntesis de las catecolaminas..

Dos son las enzimas principalmente responsables de la degradación metabólica de las catecolaminas: la monoaminoxidasas (MAO) y la catecol-oxi-metiltransferasa (COMT). La MAO, se encuentra en las células unida a la superficie de la membrana mitocondrial. Es abundante en las terminaciones nerviosas noradrenérgicas, pero también está presente en muchas otras localizaciones, como el hígado y el epitelio intestinal. La MAO convierte las catecolaminas en sus correspondientes aldehídos, los cuales, en la periferia, son rápidamente metabolizados hasta su correspondiente ácido carboxílico. La MAO es inhibida por varios fármacos, que se utilizan fundamentalmente por sus efectos sobre el sistema nervioso central. Estos fármacos provocan importantes efectos secundarios que están relacionados con alteraciones de la transmisión adrenérgica periférica. En las neuronas simpáticas, la MAO controla el contenido de dopamina y noradrenalina, de manera que el almacenamiento de noradrenalina disponible aumenta cuando se inhibe la enzima. La COMT es una enzima ampliamente distribuida que aparece en tejidos tanto neuronales como no neuronales. Actúa tanto sobre las propias catecolaminas como sobre sus productos desaminados. (Rang y col., 2003).

En nuestro estudio, centrado en el funcionamiento del sistema nervioso central, el neurotransmisor de interés es la noradrenalina (NA). Ésta se sintetiza a nivel de las terminaciones nerviosas de las neuronas adrenérgicas. Se trata de una catecolamina cuya ruta de síntesis comienza a partir del aminoácido tirosina, el cual, mediante la acción de la enzima tirosina hidroxilasa, se transforma en la L-DOPA. En este compuesto

actúa la DOPA-descarboxilasa, formándose así el precursor de la noradrenalina, la dopamina. Sobre ésta actúa la enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilasa obteniéndose la noradrenalina (figura 1.6).

La noradrenalina se almacena en vesículas y es liberada al espacio sináptico. El mecanismo de acción está regulado por receptores adrenérgicos que pueden estar presentes tanto en la membrana postsináptica como en la presináptica.



**Figura 1.5. Síntesis de catecolaminas.** Las catecolaminas se sintetizan en las terminaciones sinápticas a partir del aminoácido tirosina. Por acción de la *tirosina hidroxilasa* (TH) (es la que resulta limitante en el control de la síntesis de los productos siguientes). se obtiene la L-dopa la cual, mediante la *DOPA-descarboxilasa*, se convierte en dopamina (DA), la primera de las catecolaminas. La dopamina, por hidroxilación con la *dopamina- $\beta$ -hidroxilasa* se transforma en noradrenalina (NA), que es la segunda de las catecolaminas. Finalmente, la NA, por una metilación con la *feniletanolamina N-metiltransferasa* (PNMT), se convierte en adrenalina (A). La mayoría de las reacciones de síntesis que se muestran en esta figura tienen lugar en el axón o en el terminal sináptico.

En la ruta de síntesis también se observa, como metabolito intermedio, el neurotransmisor dopamina en cuya ruta de síntesis no se observa la actuación de la enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilasa que es la que interviene en el paso de dopamina a noradrenalina. Esta enzima no se encuentra en las neuronas dopaminérgicas lo que explica que en el sistema nervioso no haya neuronas que puedan sintetizar a la vez dopamina y noradrenalina (Fernández, 18ª Edición).

### 1.2.2. Receptores adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos son una clase de receptores metabotrópicos asociados a proteínas G, que son activados por las catecolaminas adrenalina y noradrenalina.

Éstos se subdividen en receptores alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ).

Los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos se subdividen a su vez en  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ . La activación de los receptores  $\alpha_1$ , a través de proteínas  $G_q$  aumenta la concentración de calcio ( $Ca^{2+}$ )

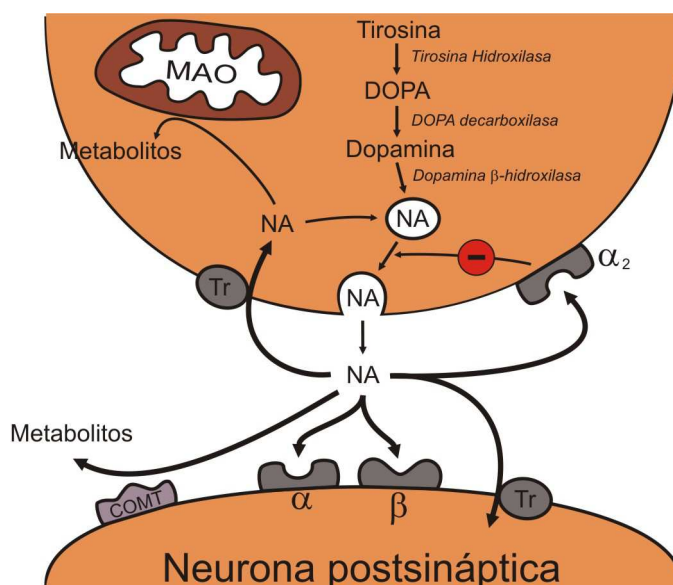
intracelular a través del diaciglicerol y del inositol trifosfato. Al ser activados por la noradrenalina tienen una función excitatoria. Los receptores  $\alpha_2$  se unen a proteínas  $G_i$ , inhibiendo la adenilato ciclasa y disminuyendo así la concentración intracelular de  $AMP_c$ . Su función es inhibitoria sobre la neurona en la que se encuentre. Sobre la neurona presináptica, cuando existe NA en el medio, ésta se une al receptor e inhibe a la propia neurona, impidiendo que se libere más NA y disminuyendo así su concentración en el espacio sináptico.

Por otro lado, los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, los cuales se subdividen a su vez en receptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ , se unen a proteínas  $G_s$ , estimulando la adenilato ciclasa y produciendo así el aumento de los niveles intracelulares de  $AMP_c$ . Su función es excitadora.

Los receptores  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  se localizan en los elementos postsinápticos, en la vecindad de las terminaciones nerviosas. Mientras que los receptores  $\alpha_2$  y  $\beta_2$  se encuentran en las regiones presinápticas y en elementos postsinápticos alejados de los sitios de conexión (que pueden ser estimulados por adrenalina circulante).

Con respecto a los mecanismos de acción de los receptores adrenérgicos, éstos pueden actuar estimulando directamente al receptor (acción directa) o liberar los neurotransmisores de las hendiduras sinápticas (acción indirecta). Incluso pueden actuar de ambas formas (acción mixta).

La liberación de NA desempeña un rol neuromodulador en extensas regiones del sistema nervioso central, modulando la actividad de las neuronas.



**Figura 1.6. Receptores noradrenérgicos.** Representación de una sinapsis noradrenérgica. Se muestra la síntesis de noradrenalina (NA), a partir del aminoácido tirosina. La NA se almacena en las vesículas sinápticas, para liberarse, como respuesta a un potencial de acción, por exocitosis de las vesículas; en cada estímulo se libera aproximadamente un 1% de la NA almacenada. Después de su interacción con el receptor, la NA puede eliminarse por distintos mecanismos. La recaptación o transportación por tejido neuronal (captación 1; tr transportador, recaptador) es probablemente el mecanismo más importante, ya que recupera alrededor de un 80% de la NA y constituye una gran fuente de NA para ser reutilizada. Este transporte se realiza contra gradiente, a través de la bomba de protones. Otros mecanismos son la recaptación por el tejido no neuronal (recaptación 2), en el que el neurotransmisor sale de la sinapsis, y el metabolismo, que como sistema de finalizar la acción de la terminal sináptica. La pequeña cantidad de NA que escapa de ser recaptada, entra en la circulación y es metabolizada por la monoamino oxidasa (MAO) y/o por la catecol-o-metil-transferasa (COMT) principalmente en sangre, hígado y riñón. La acción de la NA como neurotransmisor está mediada por los receptores adrenérgicos, que pueden localizarse en la membrana presináptica y/o en la postsináptica. Así, se puede observar que tanto los receptores  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  son postsinápticos, mientras que los receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$  se encuentran en el terminal presináptico. Los receptores presinápticos median un sistema de retroalimentación negativo, es decir, cuando son estimulados disminuye la liberación de NA.

### 1.2.3. Vías noradrenérgicas. El Locus coeruleus

Las neuronas encargadas de sintetizar noradrenalina se encuentran en las regiones tegmentales del puente y el bulbo raquídeo. Se dividen en siete núcleos distintos (Flórez, 4<sup>o</sup> Edición),

A1: Grupo del bulbo raquídeo ventral. Recibe aferencias de neuronas de la lámina I hasta el asta posterior de la médula espinal. Tiene proyecciones al núcleo parabraquial (centro apnéustico).

A2: Grupo medular dorsal. Está relacionado con el núcleo del tracto solitario.

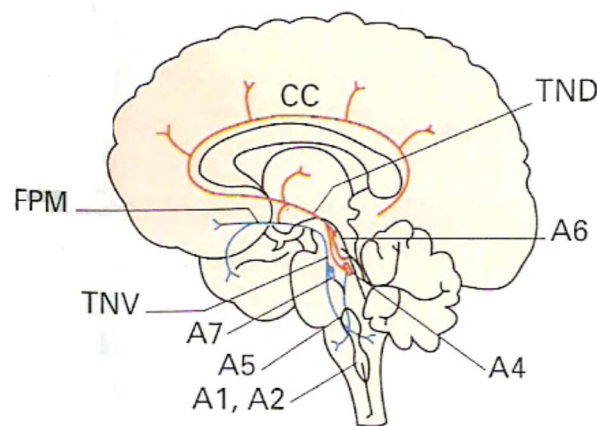
A3: Forma parte del núcleo A1.

A4: Forma parte del núcleo A6, correspondiente al Locus coeruleus.

A5: Junto al núcleo A7, forma el Locus subcoeruleus.

A6: Es el centro principal de aporte de noradrenalina en el cerebro. Es el llamado Locus coeruleus.

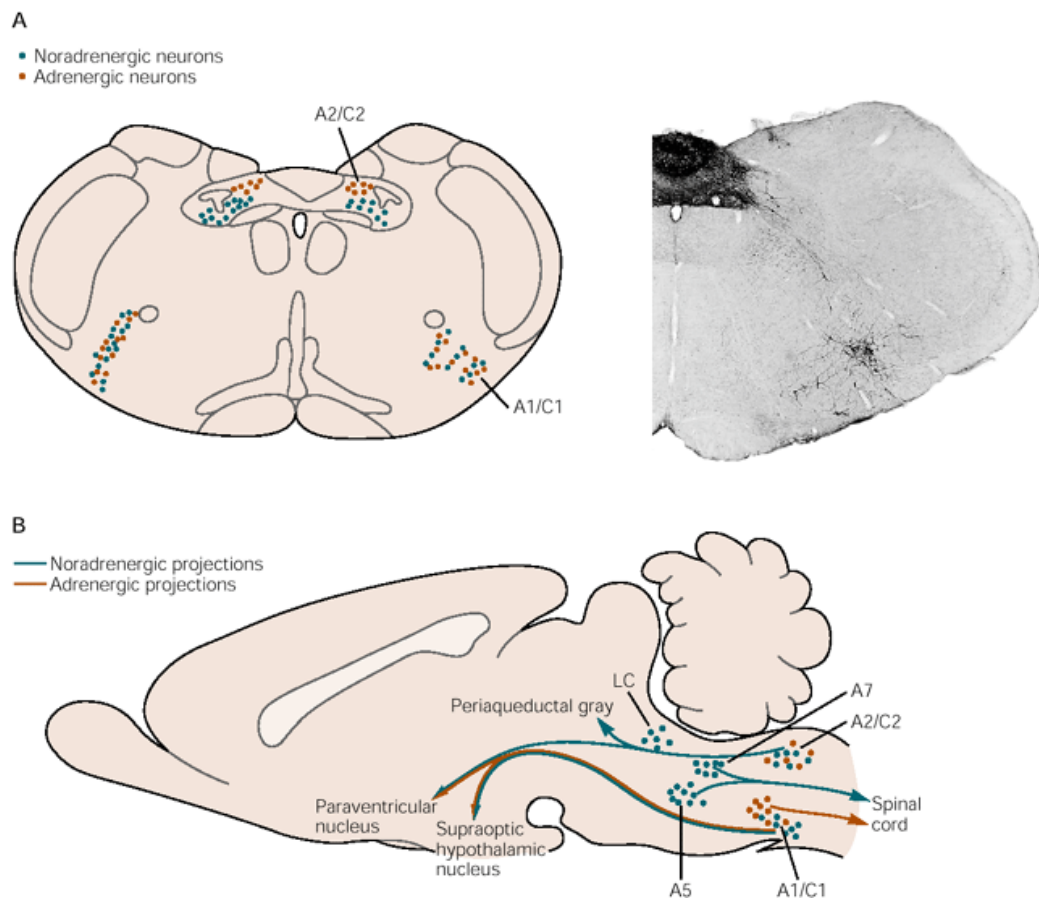
A7: Forma el Locus subcoeruleus junto con el núcleo A5.



**Figura 1.7. Principales núcleos sintetizadores de noradrenalina en el sistema nervioso central.**

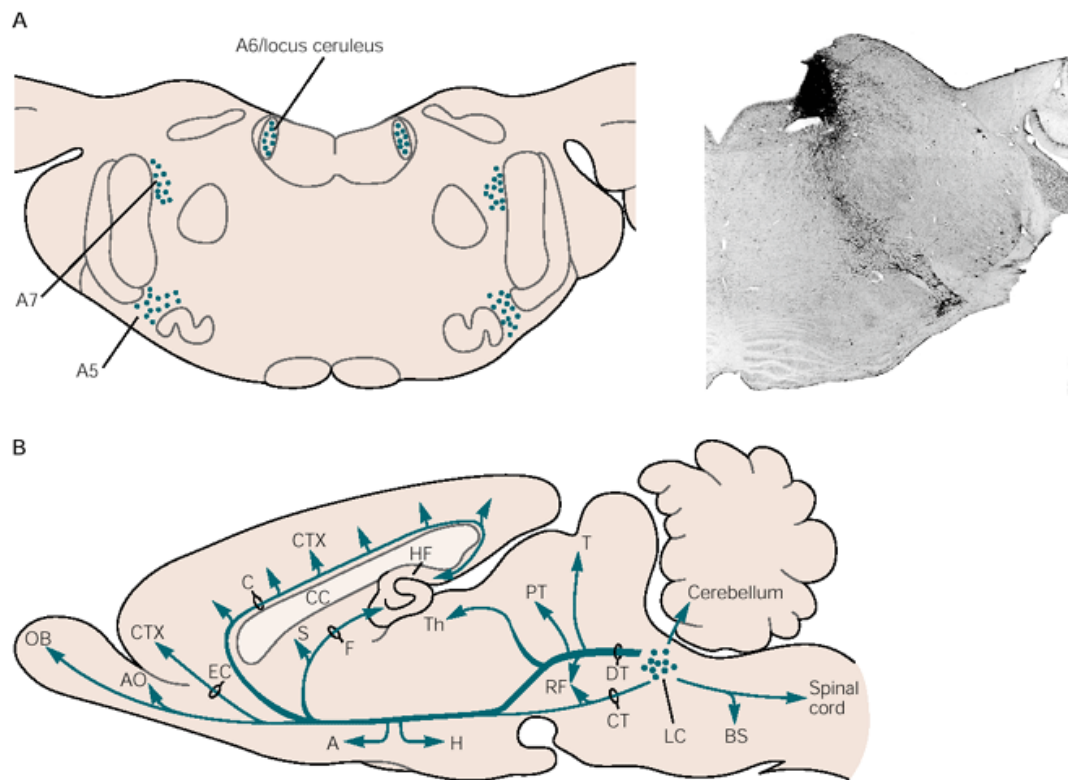
Se representa los distintos centros de síntesis de noradrenalina en el cerebro. Así se puede observar en las regiones tegmentales del puente y el bulbo raquídeo los siete núcleos principales de síntesis de este neurotransmisor. Las áreas A1 y A3 corresponden al grupo del bulbo raquídeo ventral. Estas áreas reciben aferencias de neuronas de la lámina I hasta el asta posterior de la médula espinal. Tiene proyecciones al centro apnéustico. El área A2 es el grupo medular dorsal, el cual está relacionado con el núcleo del tracto solitario. Los núcleos A4 y A6 forman el Locus coeruleus, que es el centro principal de aporte de noradrenalina en el sistema nervioso central. A5 y A7 constituyen el Locus subcoeruleus.

A diferencia de las vías dopaminérgicas y adrenérgicas, restringidas a unas áreas cerebrales concretas, las vías noradrenérgicas son más amplias e inervan gran parte del encéfalo. Las neuronas noradrenérgicas están implicadas en procesos como el aprendizaje, respuesta, atención y ansiedad. Dichas neuronas se activan durante situaciones de estrés, aumentando de este modo la liberación terminal de noradrenalina, con lo que se facilita la atención y la vigilancia.



**Figura 1.8. Neuronas noradrenérgicas y adrenérgicas en el bulbo y la protuberancia. (A)** Las neuronas catecolaminérgicas en la médula dorsal (centros noradrenérgico A2 y adrenérgicos C2) son parte del núcleo del tracto solitario. Las que están en la médula ventrolateral (el centro noradrenérgico A1 y el adrenérgico C1) se encuentran cerca del núcleo ambiguo. **(B)** La proyección adrenérgica a la médula espinal surge de las neuronas C1, mientras que la proyección noradrenérgica a la médula espinal proviene de los grupos neuronales A5 y A7 (Locus subcoeruleus), así como del Locus coeruleus (LC) (A6) en la protuberancia. La entrada noradrenérgica ascendente al hipotálamo se deriva de los dos grupos neuronales A1 y A2, mientras que la entrada adrenérgica al hipotálamo proviene de las neuronas C1.





**Figura 1.9. Neuronas noradrenérgicas en el puente. (A)** Las neuronas noradrenérgicas se distribuyen en el puente en tres grupos diferenciados: el Locus coeruleus (grupo A6) en la sustancia gris periacueductal, el grupo A7, más ventrolateral, y el grupo A5, situado a largo del margen ventrolateral del pontino tegmental. **(B)** Las neuronas de los grupos A5 y A7 inervan principalmente el tronco cerebral y la médula espinal, mientras que el Locus coeruleus presenta una salida ascendente hacia el tálamo y la corteza cerebral, así como proyecciones descendentes al tallo cerebral, el cerebelo y la médula espinal. A = amígdala; AO = núcleo olfatorio anterior; BS = tallo cerebral; C = haz cingulado; CC = cuerpo calloso; CT = tracto tegmental central; CTX = corteza cerebral; DT = haz dorsal tegmental; EC = cápsula externa; F = fornix; H = hipotálamo; HF = formación del hipocampo; LC = locus coeruleus; OB = bulbo olfatorio; PT = núcleo pretectal; RF = formación reticular; S = septum; T = tectum; Th = tálamo.

Las vías noradrenérgicas se originan de grupos neuronales presentes en el cerebro medio y el bulbo raquídeo y, en función de sus trayectorias, se dividen en un haz ventral y otro dorsal. Éste último parte del Locus coeruleus (LC), que como ya se ha mencionado anteriormente, es el principal aporte de noradrenalina, y constituye la masa más densa y compacta de neuronas noradrenérgicas. Es el origen de todas las aferencias noradrenérgicas al cerebro. Se trata del núcleo noradrenérgico más importante y en él se concentran alrededor de doce mil neuronas noradrenérgicas.

El LC está situado en la parte dorsolateral del puente, en el troncoencéfalo, localizado bilateralmente en la protuberancia (región gris central en el puente rostrolateral, bajo el IV ventrículo). Sus proyecciones alcanzan muchas áreas en el cerebro anterior, cerebelo y médula espinal. Esta red le da al LC la capacidad anatómica

de integrar la actividad funcional de muchas regiones cerebrales e influir en la función cerebral y su reactividad de forma muy importante. Es el centro crítico de la atención.

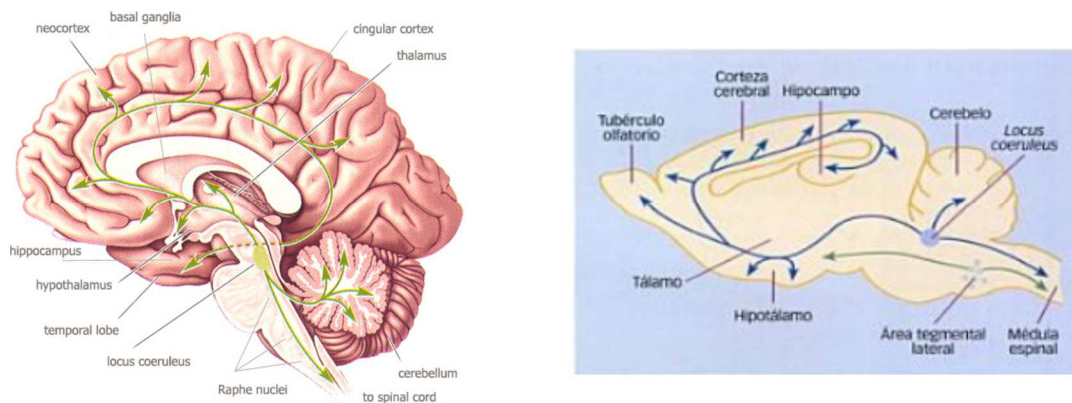
Las neuronas del LC tienen tanto ramas axonales ascendentes como descendentes.

Las descendentes van a la médula, predominantemente por el cuerno ventral a través del sistema coeruloespinal, y pueden localizarse en la columna ventrolateral. (Fernández, 18ª Edición). Los tractos descendentes también llegan al mismo tronco del encéfalo, especialmente al núcleo sensitivo del trigémino.

Las proyecciones ascendentes terminan en el diencefalo (ampliamente en el tálamo dorsal, con pequeñas proyecciones terminales en el hipotálamo), cerebelo, base del cerebro anterior (incluyendo el hipocampo, el cual controla el aprendizaje y la memoria a largo plazo), amígdala cerebral y en la corteza prefrontal (que juega un papel predominante en la atención y en la memoria a corto plazo a la hora de realizar tareas motoras complejas en ausencia de los estímulos clave), configurando una extensa red.

El LC, por su parte, recibe aferencias de muchas o posiblemente todas las modalidades sensoriales de la periferia. Las principales aferencias que recibe el LC proceden del núcleo paraventricular (NPV) localizado en el hipotálamo. Su importancia recae en la respuesta hormonal al estrés. Cabe destacar que neuronas del LC son activadas por la hormona *adrenocorticotropa*, u hormona liberadora de corticotropina, (CRH) que media la respuesta a ciertos factores asociados al estrés como puede ser la hipotensión (Valentino y cols., 1993). Existen conexiones recíprocas entre este núcleo paraventricular y el LC que conforma una vía de control hipovolémico. También existen otras aferencias desde varios núcleos del troncoencéfalo como pueden ser el núcleo del rafe dorsal (NRD) y el núcleo del rafe medial (NRM) que lo relacionan con el dolor (Revisado en Valenzuela-Harrington, 2007). La vía más importante del dolor es el tracto espinotalámico (STT) que cuando contacta con el LC, lo activa y éste induce una descarga de NA que provoca un aumento de la ansiedad y de la vigilia. El LC también tiene aferencias importantes desde otros dos núcleos del tronco encéfalo: el Núcleo Paragigantocelular (PGi) y el Núcleo Prepositus Hipoglosi (PrH). Son dos clases de aferencias con sus respectivos grupos de neuronas: aferencias excitatorias que median actividad evocada sensorialmente y aferencias tónicamente inhibitorias según el estado

de alerta y la conducta del momento. Posiblemente estas aferencias provengan del núcleo PGI y PrH, respectivamente.



**Figura 1.10. Vías noradrenérgicas.** Se representa las vías noradrenérgicas con flechas verdes en el cerebro humano de la izquierda y con flechas azules en el cerebro de una rata a la derecha. Se puede observar como las distintas proyecciones que parten del Locus coeruleus alcanzan muchas áreas del cerebro anterior, cerebelo y médula espinal. Esta red le da al LC la capacidad anatómica de integrar la actividad funcional de muchas regiones cerebrales e influir en la función cerebral y su reactividad de forma muy importante.

Algunas de las aferencias del LC lo relacionan con el proceso del *arousal* que puede interpretarse como el paso de sueño profundo a sueño más ligero (Brown y cols., 2001; Jones, 2003). Las neuronas del LC poseen una actividad espontánea que varía según el estado del ciclo vigilia-sueño. Estas neuronas presentan la máxima frecuencia de descarga durante la vigilia, disminuye esta frecuencia durante el sueño ligero y haciéndose mínima en el sueño REM. El estudio de la actividad eléctrica de las neuronas del LC sugiere que este silencio durante el sueño REM se debería a la inhibición activa de las neuronas. Esto coincide con los niveles de liberación de noradrenalina medida en la corteza (Aston-Jones, 1981).

En cuanto a procesos de aprendizaje y la memoria también juega un papel clave. Existen proyecciones ascendentes del LC del tracto noradrenérgico dorsal (TNAD) que ejercen función en la modulación de la atención y memoria. Este TNAD está relacionado con el procesamiento de la información ante una situación nueva o que requiera atención (Revisado en Valenzuela 2007). La hiperactividad del LC interrumpe actividades automáticas que son incompatibles con respuestas conductuales que requieren un alto grado de alerta e interacción con estímulos ambientales. La hipo o hiper función del LC

influye sobre la actividad sensorial y motora, favoreciendo respectivamente a programas conductuales automáticos, o respuestas a estímulos ambientales relevantes. La liberación de noradrenalina por factores de atención, ciclo vigilia o sueño parece ser esencial para el aprendizaje y es responsable de la consolidación de la memoria (Gibbs, 2000).

Debido a la temprana ontogenia del sistema noradrenérgico, también se ha llevado a pensar que este sistema ejerce las funciones de regulación en el desarrollo de la corteza. Numerosos estudios han documentado su papel en los procesos de desarrollo y en el mantenimiento de la plasticidad cortical (Blue y Parnavelas, 1982; Bear y Singer, 1986 ; Lidow y Rakic, 1994; Osterheld-Haas y cols., 1994). La fuerte expresión de los receptores adrenérgicos durante la corticogénesis también ha llevado a la hipótesis de que estos receptores están implicados en diferentes procesos de desarrollo, incluyendo la migración neuronal (Wang y Lidow, 1997) (Andrews y Parnavelas, 2012).

#### **1.2.3.1. Trastornos neurológicos y psiquiátricos**

Las lesiones o el mal funcionamiento del sistema noradrenérgico están implicadas también en diversos trastornos, como pueden ser la epilepsia, el Parkinson, el Alzheimer, la depresión o el estrés. Las lesiones en las neuronas del LC se han implicado en fenómenos de epilepsia y en la enfermedad de Parkinson. La pérdida parcial de neuronas del LC puede explicar la disminución del estado de alerta, la menor reacción a estímulos dolorosos y la alteración del ciclo circadiano de los enfermos de Alzheimer.

Por otro lado el LC sería fundamental en gran parte de la respuesta del síndrome de abstinencia. El rol del LC en tal síndrome explicaría la efectividad del uso de clonidina (agonista de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos) en el tratamiento de la adicción a opiáceos. Se ha demostrado que durante el estrés aumenta la degradación de la noradrenalina en regiones cerebrales tales como la corteza y el hipocampo, para los cuales el LC es la única fuente de NA. Igualmente, la depresión podría asociarse con una hipofunción del LC. A partir de diversos estudios realizados con animales se ha propuesto también al LC como mediador de la ansiedad y sus manifestaciones conductuales. Sin embargo, en experimentos realizados con humanos no se ha llegado a la misma conclusión, por lo que esto sugiere que el LC en humanos, podría ocuparse del control del estado de alerta y aprendizaje y no estar implicado directamente en los fenómenos relacionados con la ansiedad.

### 1.3. RELACIÓN GENERADOR DEL RITMO RESPIRATORIO Y EL LOCUS COERULEUS

Ya se ha mencionado que las neuronas del Locus coeruleus (LC) son el principal aporte de noradrenalina (NA) en el sistema nervioso central (SNC) y las propuestas que defienden su papel durante el desarrollo, por lo que cabe esperar que su alteración durante el desarrollo del individuo durante la etapa postnatal provoque efectos sobre el GRR al verse variaciones en la concentración de noradrenalina liberada.

El grupo de neuronas del Locus subcoeruleus (A5) y del Locus coeruleus (A6) producen efectos antagónicos en el generador del ritmo respiratorio (GRR). Estos efectos perduran toda la vida del individuo y no solo en la etapa neonatal.

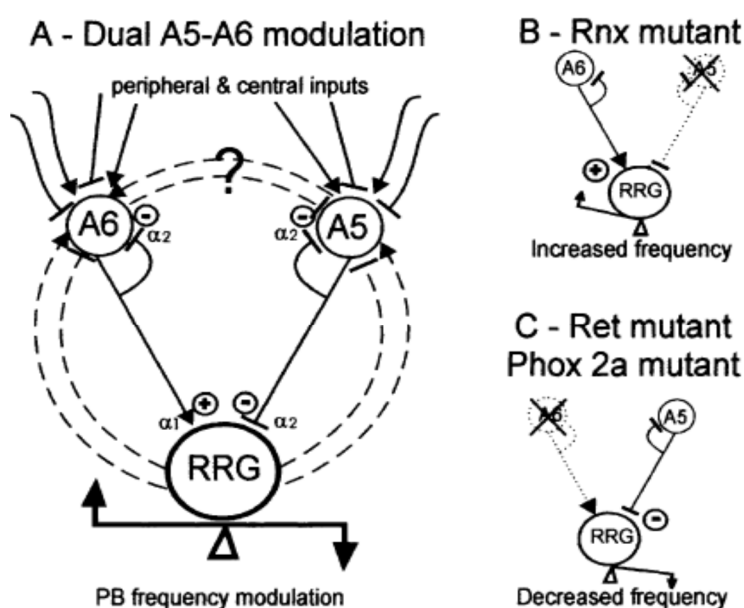
Las aplicaciones locales de noradrenalina y las lesiones electrolíticas sugieren que los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  que median la depresión rítmica inducida de NA están localizados dentro de la parte rostral ventrolateral de la médula, probablemente dentro o cerca del complejo Pre-Bötzinger; que como hemos dicho anteriormente, se ha considerado el marcapasos de la respiración a nivel del sistema nervioso central (Hilaire y cols., 2004).

La liberación de NA en el Locus subcoeruleus inhibe la generación del ritmo respiratorio en ratones neonatales mientras que la liberación en el Locus coeruleus , provoca la estimulación. Este efecto se basa en el juego de los receptores adrenérgicos,  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  que son los responsables de inhibir o estimular la neurona.

A nivel de A5 actúan los receptores  $\alpha_2$ . La noradrenalina es detectada por el receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico produciendo la inhibición sobre el GRR. A su vez, A5 también tiene receptores  $\alpha_2$  por lo que la inhibición ante la presencia de noradrenalina también se produce sobre él mismo. Es un ciclo en el que se va regulando la noradrenalina según la necesidad. Cuando se inhibe el GRR disminuye la frecuencia respiratoria, como se muestra en el esquema de la figura 1.11.C, donde se muestra un neonato de ratón con una mutación knock-out en el gen *Phox2a* o en el gen *Ret*, las cuales provocan la carencia del núcleo A6.

Por el contrario, en A6 existen receptores adrenérgicos del tipo  $\alpha_1$  cuyo efecto es el contrario al producido por los receptores  $\alpha_2$ . Cuando la noradrenalina es detectada por los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ , el efecto producido es de estimulación del generador del

ritmo respiratorio. En este caso, se aumenta la frecuencia respiratoria. El Locus coeruleus también consta de receptores  $\alpha_2$ , los cuales bloquean la liberación de NA hasta el GRR de la misma manera que ocurre en el Locus subcoeruleus. Así se ilustra en la figura 1.11.B, donde la mutación en el gen que codifica para el factor Rnx provoca la ausencia del Locus subcoeruleus (A5) (Hilaire y cols., 2004).



**Figura 1.11. Control del Locus coeruleus y el Locus subcoeruleus sobre el generador del ritmo respiratorio.** (A) Se representa la regulación sobre el generador del ritmo respiratorio (RRG o GRR) efectuada por el núcleo Locus coeruleus (A6) y por el Locus subcoeruleus (5). A nivel de A5 actúa el receptor adrenérgico  $\alpha_2$ . Cuando la noradrenalina es detectada por este receptor se produce la inhibición sobre el GRR. A su vez, como se puede ver en la imagen, A5 también tiene receptores  $\alpha_2$  por lo que la inhibición ante la presencia de noradrenalina también se produce sobre él mismo. Por el contrario, en A6 existen receptores adrenérgicos del tipo  $\alpha_1$  cuyo efecto es el contrario al producido por los receptores  $\alpha_2$ . Cuando la noradrenalina es detectada por los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ , el efecto producido es de estimulación del generador del ritmo respiratorio. El Locus coeruleus también consta de receptores  $\alpha_2$ , los cuales bloquean la liberación de NA hasta el GRR de la misma manera que ocurre en el Locus subcoeruleus. (B) Representación del control del generador del ritmo respiratorio en un mutante para el gen que codifica el factor Rnx, que provoca la ausencia del Locus subcoeruleus. En este individuo sólo controla el GRR el núcleo A6, por lo que al detectar NA los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  estimulan el GRR, aumentando así la frecuencia respiratoria (C) En la imagen se muestra un individuo con mutación knock-out en el gen Phox2a o en el gen Ret, las cuales provocan la carencia del núcleo A6. En este individuo sólo controla el GRR el núcleo A5, por lo que al detectar NA los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  inhiben el GRR. En este caso, se disminuye la frecuencia respiratoria. Figura tomada de Hilaire y cols., 2004.

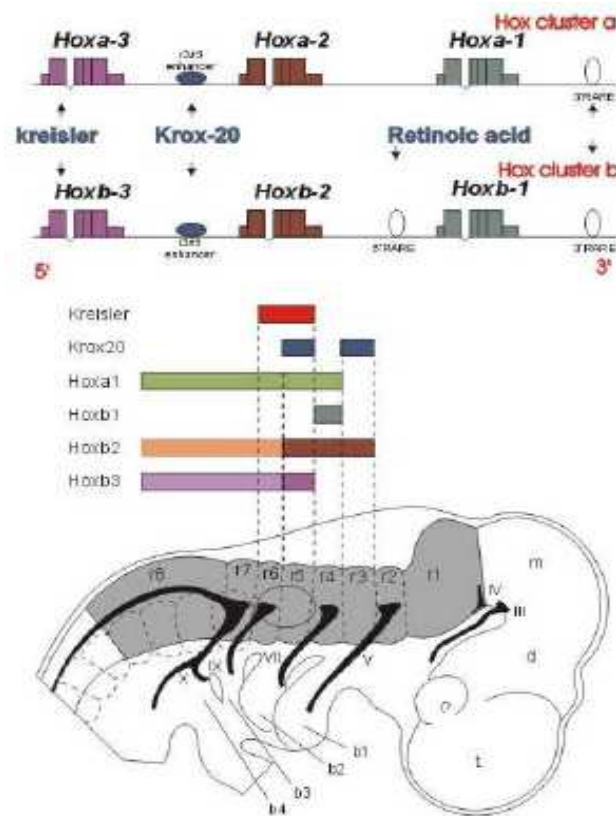
Estos estudios demuestran que la especificación del sistema adrenérgico relacionada con el control que ejerce sobre el sistema respiratorio tiene lugar durante el desarrollo embrionario, lo que hace que nuestro interés se centre en los acontecimientos que tienen lugar en esta etapa del desarrollo del individuo. Por ello conviene resaltar que

es fundamental conocer el desarrollo embrionario del troncoencéfalo, ya que es a este nivel donde empiezan a formarse las primeras estructuras necesarias para la generación del ritmo respiratorio.

#### **1.4. DESARROLLO EMBRIONARIO DEL TRONCO DEL ENCÉFALO**

El sistema nervioso de los vertebrados se desarrolla a partir del ectodermo, la más externa de las capas del embrión en sus primeras etapas. Aparece como un epitelio columnar engrosado, conocido como placa neural. Al mismo tiempo, la placa neural se pliega para formar a una estructura tubular, el tubo neural. A lo largo del tubo neural, se generan tres vesículas cerebrales que dan origen a las tres grandes divisiones del encéfalo: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el romboencéfalo.

Durante el desarrollo embrionario, el tronco del encéfalo, localizado en el romboencéfalo, aparece subdividido en una serie de segmentos denominados rombómeros (r1-r8), los cuales tienen características distintas desde el punto de vista molecular. La segmentación del tronco del encéfalo comienza en roedores alrededor del día 7 de gestación (E7) (Lumsden y Krumlauf, 1996) durante el cual, se establece un patrón de expresión de genes del desarrollo. Entre estos genes del desarrollo, se encuentran los genes Hox, los cuales dependen de un gradiente endógeno de ácido retinoico (Gavalas, 2002; Maden, 2002) y de la expresión de otros genes, como Kreisler y Krox20. Los distintos patrones de expresión génica son los que permiten la especialización de los subtipos neuronales, confiriéndoles a las neuronas de los distintos rombómeros propiedades diferentes, confiriéndole así a las células en formación la que será su identidad neuronal definitiva.

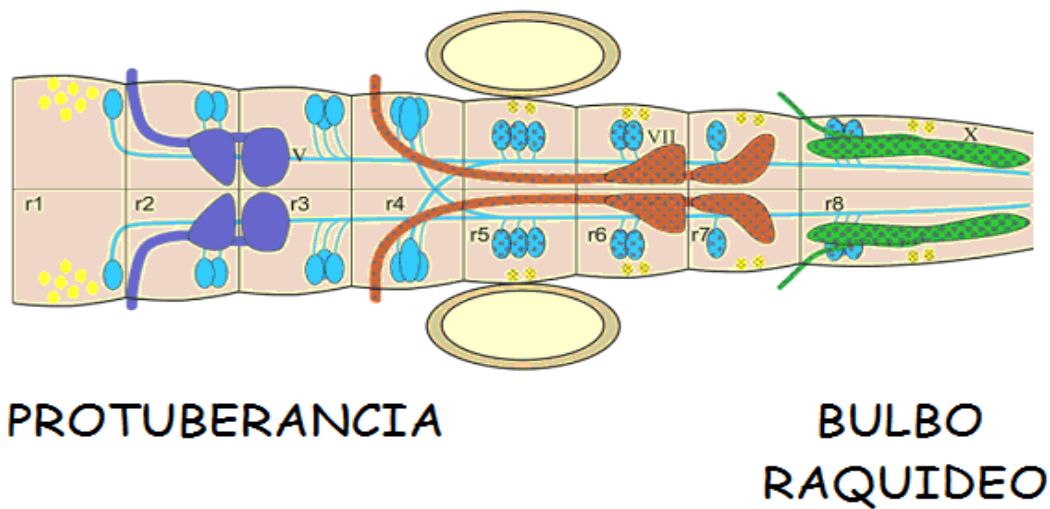


**Figura 1.12. Segmentación durante el desarrollo embrionario del tronco del encéfalo en ratón.**

Se representa el tronco del encéfalo, localizado en el romboencéfalo, subdividido en una serie de segmentos denominados rombómeros (r1-r8), los cuales tienen características distintas desde el punto de vista molecular. La segmentación del tronco del encéfalo comienza alrededor del día 7 de gestación (E7) durante el cual, se establece un patrón de expresión de genes del desarrollo. Entre estos genes del desarrollo, se encuentran los genes Hox, los cuales dependen de un gradiente endógeno de ácido retinoico y de la expresión de otros genes, como Kreisler y Krox20. Se puede observar en la imagen inferior, los distintos patrones de expresión génica de algunos de los genes de desarrollo mencionados anteriormente y los lugares de interacción de algunos de ellos con las regiones de control de expresión genética en la cadena de ADN (arriba). Nótese también la existencia de los sitios de interacción del ácido retinoico con el ADN (retinoic acid response elements: RARE) próximo a los genes Hoxa1 y Hoxb1. Estos patrones de expresión génica son los que permiten la especialización de los subtipos neuronales, confiriéndoles a las neuronas de los distintos rombómeros propiedades diferentes, confiriéndole así a las células en formación la que será su identidad neuronal definitiva.

Como puede verse en la figura 1.13, durante el desarrollo embrionario las neuronas noradrenérgicas del romboencéfalo se originan en dos regiones diferentes. Así los rombómeros englobados en el intervalo r5-r8 darán origen a las neuronas noradrenérgicas bulbares y el rombómero 1 dará lugar a las neuronas del Locus coeruleus (White y Schilling, 2008).



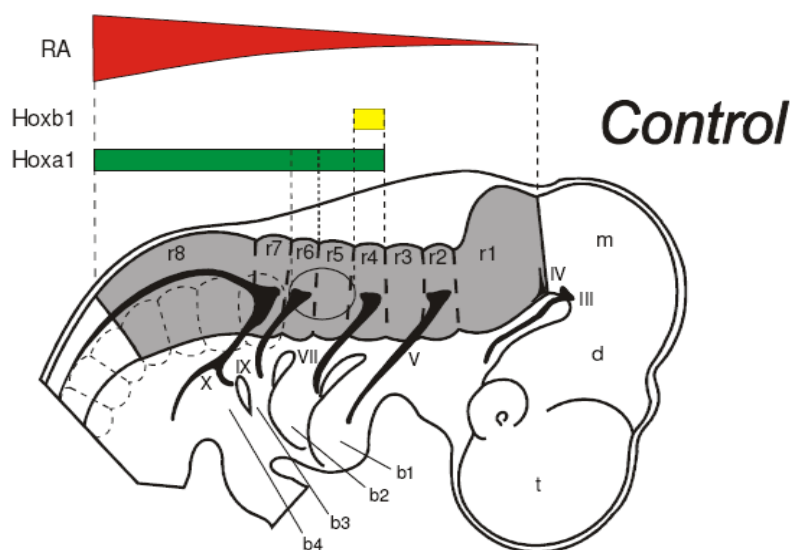


**Figura 1.13. Organización segmentaria del romboencéfalo y sus derivados neuronales tempranos.** Vista dorsal (anterior a la izquierda) del romboencéfalo tardío, indicando su división en 8 rombómeros (r1 – r8) y los distintos grupos neuronales. En color morado se muestra las neuronas correspondientes al nervio trigémino (V). En naranja se indican las correspondientes al nervio facial (VII). Las neuronas del nervio vago (X) se representan en color verde. Y finalmente, en color amarillo, se muestran las neuronas noradrenérgicas troncoencefálicas. Las neuronas noradrenérgicas localizadas en los rombómeros r5, r6, r7 y r8, darán origen a las neuronas noradrenérgicas bulbares, mientras que las situadas en el rombómero 1 originarán las neuronas del Locus coeruleus. Figura tomada de White y Schilling, 2008.

#### 1.4.1. Efectos del ácido retinoico en la estructuración del tronco del encéfalo

Como ya se ha mencionado anteriormente, los genes del desarrollo Hox dependen de un gradiente endógeno de ácido retinoico. La expresión génica de estos genes Hox en los diferentes rombómeros, surge en respuesta a las diferentes concentraciones de ácido retinoico, transducido por los receptores de RA (RAR $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). Diversos estudios defienden que el ácido retinoico puede cambiar esta organización rombomérica a través de cambios en los dominios de expresión de los genes Hoxa1 y Hoxb1, actuando sobre los “elementos de respuesta a RA” (retinoic acid response elements, RARE). La morfología de algunas de las anomalías inducidas por el RA aplicado de forma exógena se ha interpretado como una transformación de identidades celulares rostrales a identidades celulares más caudales (Wood y cols., 1994). Así, los retinoides juegan un papel crítico en el modelado, la segmentación, y neurogénesis del romboencéfalo posterior. La ausencia de la señalización de retinoide desde una etapa dada del desarrollo en adelante indica que la señalización es dependiente tanto de la

etapa como de la concentración. Por lo tanto, se necesita un gradiente de ácido retinoico más alto en la región posterior para la organización correcta de los rombómeros.



**Figura 1.14. Segmentación del tronco del encéfalo de ratón y ácido retinoico.** Representación de la subdivisión en distintos rombómeros (r1-r8) del tronco del encéfalo en el desarrollo embrionario. Se muestra la expresión de los genes de desarrollo Hox (b1 y a1) y su requerimiento de un gradiente endógeno de ácido retinoico (RA) para su correcta expresión.

Estudios realizados por Guimarães y cols. (2007), establecieron que ratones tratados con dosis subteratógenas de ácido retinoico al inicio del proceso de segmentación (E7,5), originaron camadas aparentemente normales, con una supervivencia del 100%. Sin embargo, estas dosis de ácido retinoico causaban alteraciones en el funcionamiento del sistema respiratorio neonatal, caracterizado por la aparición de episodios de respiración episódica (Hiperneic episodic breathing, HEB).

Los estudios anatómicos demostraron modificaciones estructurales leves a nivel del puente rostral. Por todo ello, esta fase embrionaria es crucial para el desarrollo de redes neuronales del tronco del cerebro que regulan funciones vitales, tales como la respiración.

En ratones, las anomalías del ritmo respiratorio ya han sido descritas tras la inactivación de factores de transcripción cuyos patrones de expresión están restringidos a ciertos rombómeros (revisado por Lumsden y Krumlauf, 1996); por ejemplo Hoxa1, con la

expresión rostral que une el borde entre los rombómeros 3 y 4, o Krox20, expresado en los rombómeros 3 y 5 (Jacquin y cols., 1996; Domínguez del Toro y cols., 2001; Chatonnet y cols., 2002). Las mutaciones Krox20  $\rightarrow$  y Hoxa1  $\rightarrow$ , eliminan el grupo respiratorio parafacial derivado de los rombómeros 3 y 4, un sistema neuronal antiapneico, que puede ejercer una función que promueve el ritmo del complejo más caudal pre-Bötzinger (Chatonnet y cols., 2002) en los pocos primeros días después de nacimiento.

Desde un punto de vista funcional-comportamental, la exposición al ácido retinoico ha sido estudiada, por Holson y cols., durante la etapa gestacional en ratas. En este caso se procedió a la inyección de RA en tres períodos de exposición, cada uno a tres dosis consecutivas diarias. Esta exposición abarcó los periodos de gestación (GD) 8 a 10, 11 a 13 o 14 a 16. Esos intervalos fueron escogidos debido a que el periodo de gestación comprendido entre los días 8 y 10 en ratas, es el período de máxima sensibilidad para retinoides (equivalente al día embrionario 7,5 (E7,5) empleado en ratones). Las conclusiones obtenidas fueron que la exposición a RA en las dosis de los tres periodos de exposición produjo una evidente reducción en la actividad en campo abierto inducida por anfetaminas, pero ningún efecto en la actividad exploratoria o en el reflejo de sobresalto. En cuanto a la prueba de aprendizaje en laberinto, los resultados no evidenciaron problemas de aprendizaje en ratas expuestas al ácido retinoico.

Por otro lado, el grupo de Domínguez del Toro ha observado que el tratamiento con dosis no teratogénicas de RA altera la adquisición de respuestas condicionadas, afectando por tanto, al aprendizaje asociativo (García-Sanz y cols., manuscrito en preparación).

#### **1.4.2. Papel del receptor nuclear EAR2 en el desarrollo de las neuronas del locus coeruleus. El mutante EAR2**

Como se ha mencionado anteriormente, numerosos genes del desarrollo determinan las propiedades de las neuronas que se generan en uno u otro rombómero.. Estudios recientes han revelado un nuevo grupo de genes que intervienen en el desarrollo de grupos específicos de neuronas, como las del sistema noradrenérgico. Es el caso del receptor nuclear EAR2, también llamado Nr2f6 (Warnecke y cols., 2004).

EAR2 es un miembro de la subfamilia COUP-TF, perteneciente a los receptores nucleares hormonales. Estos receptores son factores de transcripción que regulan la expresión de genes específicos y son los encargados de regular numerosos procesos fisiológicos y del desarrollo (Beato y cols., 1995; Kastner y cols., 1995; Mangelsdorf y cols., 1995; Thummel, 1995).

Esta familia de proteínas consta de receptores que se unen a ligandos específicos y de receptores "huérfanos", de los cuales algunos se unen a pequeñas moléculas mientras que otros no se unen a ningún ligando; son los receptores "huérfanos" propiamente dicho. Algunos de estos receptores huérfanos, controlan diversas facetas del desarrollo del sistema nervioso central, siendo el EAR2 uno de ellos (Warnecke y cols., 2004).

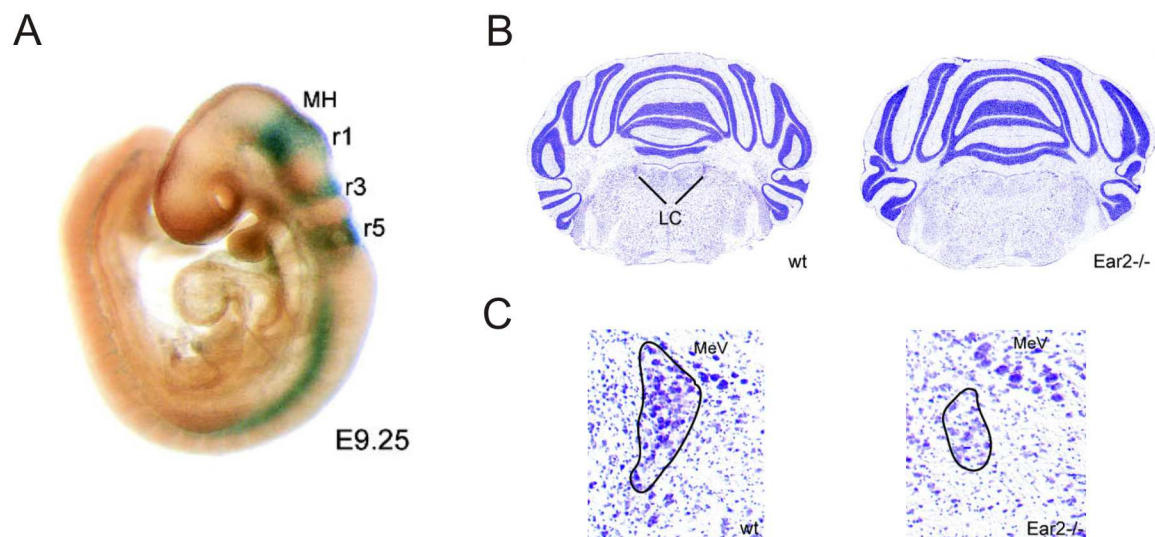
El receptor nuclear EAR2 se expresa de forma transitoria, alrededor del día embrionario 8,5, en la parte rostral del romboencéfalo en el que se encuentra el Locus coeruleus.

El desarrollo embrionario del LC está regulado por una cascada de señalización (Mash1  $\rightarrow$  Phox2b, Phox2a) que aparece interrumpida en los embriones EAR2 (-/-), revelado por una reducción aproximada de tres veces el número de células positivas para Phox2a y Phox2b (células progenitoras del LC). Sin embargo, en estos mutantes Mash1 no se ve afectada. Esto sitúa la acción de EAR2 entre Mash1 y Phox2a y Phox2b. A su vez, Phox2a y Phox2b también regulan la expresión de la tirosina hidroxilasa (TH) y de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa que, como se ha mencionado anteriormente, son enzimas clave para la síntesis de noradrenalina (Warnecke y cols., 2004). En ratones mutantes knock-out EAR2 se ha observado una reducción dorsolateral de aproximadamente el 70% de las neuronas del núcleo Locus coeruleus (figura 1.15.B y C). La reducción del número de células del LC es aparente ya en la etapa progenitora y no es un resultado de la muerte celular de las neuronas post-mitóticas. Estas neuronas no-aparecidas son las que normalmente proyectan a estructuras cerebrales rostrales.

Como se ha mencionado anteriormente, las proyecciones que proceden del LC aseguran que la noradrenalina y otros neurotransmisores de este núcleo alcanzan casi todas las regiones del sistema nervioso central. Por lo que este núcleo influye en un amplio espectro de procesos fisiológicos y de comportamiento como el ciclo de la

excitación, el estado de alerta, el ciclo sueño/vigilia, la nocicepción, la ansiedad, el estrés, la cognición, la memoria y la atención.

Diversos experimentos revelan que los mutantes EAR2 nacen vivos, sobreviven y son fértiles y tienen un retraso de arrastre, en los ciclos de luz-oscuridad y se adaptan de manera menos eficiente a los horarios de alimentación durante el día. Las neuronas en la división dorsal del LC contribuyen a la regulación del reloj en el cerebro anterior, al menos en parte, a través de la liberación selectiva de noradrenalina en el área cortical (Warnecke y cols., 2004). En el mismo estudio se comprobó que los ratones EAR2 (-/-) tenían incrementada la nocicepción (otra de las funciones atribuidas al LC).



**Figura 1.15. Efectos de la mutación EAR2.** (A) Imagen que muestra la expresión del gen EAR2, mostrado en color verde (tinción *lacZ*), en los rombómeros 1, 3 y 5, en el día embrionario 9,25. Nótese como el gen, además de en los rombómeros mencionados, se expresa en el mesencéfalo dorsal y el tejido adyacente romboencefálico. (B) Tinción Nissl de un corte coronal de un cerebro de ratón adulto silvestre (WT), a la izquierda, frente a un corte del cerebro de un ratón knock out EAR2 (EAR2  $-/-$ ) a la derecha. (C) Vista con más detalle de los cortes de la figura 1.13.B de la zona correspondiente al Locus coeruleus, señalada con una línea negra, en un ratón silvestre (izquierda), frente a un ratón mutante EAR2 (derecha). Nótese como tanto en la figura B como la C, se muestra una reducción drástica del número de neuronas que constituyen el Locus coeruleus. (MeV, núcleo mesencefálico del quinto nervio craneal). Figura tomada de Warnecke y cols., 2004.

## 1.5. DESARROLLO POSTNATAL DEL SISTEMA NORADRENÉRGICO

Durante el desarrollo postnatal se produce una maduración funcional que afecta a numerosas estructuras del tronco del encéfalo. Entre ellas destacamos la maduración del sistema noradrenérgico a nivel del puente.

En esta etapa, crítica para el desarrollo conductual y neuroendocrino, los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  alcanzan los valores máximos de expresión en el tronco del encéfalo (Happe y col., 1999; Iushkova y Dygalo, 1995) y se han propuesto como posibles reguladores de procesos durante el desarrollo (Dygalo y col., 2000; Happe y col., 2004). La manipulación neonatal de dichos receptores en la zona del puente ha demostrado tener consecuencias en el adulto, que afectaban a funciones reflejas como la respuesta de sobresalto y la inhibición por prepulso (Shishkina, y col., 2001; Shishkina y col., 2002; Shishkina y col., 2004).

Según el estudio de Dygalo y col. (2004), la densidad de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  muestra un pico durante la primera semana de vida en ratas. Sin embargo, en la corteza la densidad de estos receptores es menor. En adultos el aumento no se produce y la densidad de estos receptores es mucho menor (Mansouri y cols., 2001). Esto permite a distintos agonistas y antagonistas de estos receptores tener efectos específicos en el desarrollo de la estructura cerebral.

Existen distintos fármacos que actúan sobre dichos receptores, actuando como agonistas o antagonistas. Un compuesto agonista de un receptor  $\alpha_2$  es aquel que actúa sobre dicho receptor, activando y estimulando la respuesta del receptor en cuestión, produciendo una disminución en los niveles de AMPc. Siendo éste mayoritariamente presináptico, cabe recordar que el efecto será inhibitorio. Por el contrario, un antagonista  $\alpha_2$  será aquella sustancia que bloquea al receptor, inactivando su función. Uno de los lugares de acción de los receptores  $\alpha_2$  es el Locus coeruleus. Aquí, como hemos mencionado, su efecto es el de controlar la liberación de noradrenalina.

### 1.5.1. Clonidina

La clonidina es un agonista de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgico. Inhibe la excitabilidad de la neurona originando la disminución de su actividad, reduciendo así la

liberación de noradrenalina (NA) en el medio. Actúa sobre el receptor contribuyendo a su función inhibitoria.

En distintos estudios realizados, se ha obtenido que la administración aguda de clonidina disminuye la actividad del Locus coeruleus, interrumpiendo la atención en pruebas difíciles de atención sostenida (Revisado por Valenzuela y cols., 2007).

Además de actuar en los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgico localizados en el Locus coeruleus, la clonidina actúa también sobre los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  localizados en las neuronas de las astas posteriores de la médula espinal y controlando la función de numerosos órganos corporales.

Este fármaco disminuye la presión arterial, la frecuencia cardiaca, el gasto cardiaco y produce sedación en relación a la dosis. A diferencia de los opiodes, produce menor depresión respiratoria, y a diferencia de las benzodiacepinas no potencia la depresión respiratoria con opiodes.

La clonidina debe sus acciones hipotensoras a la capacidad de estimular los receptores  $\alpha_2$  en el hipotálamo. Estos receptores son inhibidores y provocan depresión de los impulsos que vienen desde los centros vasomotores. Cualquier interrupción de las vías desde los centros vasomotores interfiere con esta acción.

La clonidina se usa como parte de una solución anestésica para lactantes y niños (Ansermino, 2003). Otra de sus funciones es que puede ser útil para la protección a prematuros de daños neurológicos permanentes (Laudenbach y cols., 2002). Si bien, también se ha demostrado que la administración de clonidina aumenta la fragmentación del ADN en el tronco del encéfalo en fetos y recién nacidos, lo que la implica al sistema noradrenérgico en el desarrollo embrionario de esta estructura (Dygalo y cols, 2004) (ver figura 14).

Según Gorter y cols. (1990), la reducción neonatal de NA por inyección subcutánea diaria de clonidina conlleva a una hipersensibilidad de NA en las células CA1 del hipocampo, afectando de forma permanente a procesos de plasticidad y en el kindling epileptogénico en adultos. Igualmente se ha comprobado (Mirmiran y cols., 1985) que la administración crónica de clonidina actúa sobre los neurotransmisores de NA, suprimiendo el desarrollo del sueño REM en neonatos de ratas. De adultos, esas ratas

tratadas neonatalmente con Clonidina muestran hiperactividad, hiperansiedad, reducción de la conducta sexual, trastorno del sueño y reducción del tamaño cortical cerebral.

Los efectos adversos de este medicamento son, en general, frecuentes aunque transitorios y reversibles. El perfil toxicológico de este fármaco es similar al del resto de vasodilatadores. Los efectos adversos más característicos son:

- Frecuentemente: (10-25 %): sequedad de boca, mareos, cefalea, somnolencia y estreñimiento.

- Ocasionalmente (1-9 %): hipotensión ortostática, depresión, ansiedad, fatiga, náuseas, anorexia, alteraciones del sueño, reducción de la libido, impotencia, retención o incontinencia urinaria, escozor ocular, prurito y erupciones exantemáticas.

- Raramente (<1 %): bradicardia, bloqueo auriculoventricular, cambios en el ECG, insuficiencia cardíaca, pesadillas, alucinaciones, síndrome de Raynaud y ginecomastia.

Diversos estudios en animales mostraron un aumento de las resorpciones fetales en ratas a las que se les administró 1,2 veces la dosis terapéutica humana durante dos meses antes del apareamiento. La clonidina atraviesa la placenta, alcanzando en el feto concentraciones séricas correspondientes a la mitad de los niveles maternos. No hay estudios adecuados y bien controlados en humanos, aunque se han descrito casos aislados de dismorfogénesis asociados a su uso (tetrafocomelia, labio leporino, hendiduras en el paladar, etc.). El uso de este medicamento sólo se acepta en caso de ausencia de alternativas terapéuticas más seguras.

En referencia al periodo de lactancia, la clonidina también pasa a la leche materna en cantidades significativas pero no parece causar ningún efecto en el lactante. No obstante, se desconocen los efectos a largo plazo. Debido a esto, la administración de clonidina está contraindicada durante el embarazo, la lactancia y en niños menores de 12 años.

En 1984 Bousquet y col., estudiando la relación de estructura/actividad del efecto hipotensor inducido por la inyección directa de clonidina en la región rostral ventrolateral del bulbo, sugirieron que dicho efecto era mediado por otro tipo de receptores diferentes de los adrenérgicos (que no inducían descensos de la presión arterial), mientras que la inyección de imidazolinas o sus análogos siempre producían caídas dosis dependientes



de la presión arterial. Así postularon la existencia de receptores específicos para imidazolinas.

Estudios posteriores han demostrado la existencia de sitios específicos para imidazolinas comparado con los sitios  $\alpha_2$  adrenérgicos. De Vos y cols. (1994) confirmaron que la distribución de los receptores imidazólicos no era idéntica a aquella de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. El análisis de los mecanismos de producción del efecto hipotensor y sedante de drogas del tipo de la clonidina permitió confirmar la existencia de dos tipos funcionalmente diferentes de receptores. Tibirica y cols.(1991) demostraron en la rata que el efecto sedante de estas drogas era mediado por la unión a receptores alfa adrenérgicos en el Locus coeruleus mientras que la actividad hipotensora dependía de la unión de estructuras imidazólicas a la zona rostral ventrolateral del bulbo.

## **1.6. APRENDIZAJE Y MEMORIA**

Lo que conocemos como aprendizaje consiste en un cambio perdurable de la conducta o en la capacidad de conducirse de manera dada como resultado de la práctica o de otras formas de experiencia (Shuell, 1986).

Si se examina esta definición, se puede denotar que hay tres criterios por los cuales es posible concretar el aprendizaje. Uno de estos criterios es el cambio conductual o el cambio en la capacidad de comportarse. El aprendizaje sería, pues, cuando alguien se vuelve capaz de hacer algo distinto de lo que hacía antes. Aprender requiere el desarrollo de nuevas acciones; es decir, una modificación de las ya existentes. Otro de los criterios propios a esta definición es que el cambio producido debe perdurar en el tiempo. Aunque, debido a que existe el olvido, estos cambios conductuales no tienen que durar un largo periodo para catalogarlos como aprendidos. El tercer criterio es que el aprendizaje ocurre por práctica u otras formas de experiencia (Schunk, 1997). Así, el aprendizaje es el proceso mediante el cual los organismos modifican su conducta para poder adaptarse al medio que los rodea. Es el principal modo de adaptación de los seres vivos. De este modo, podemos considerar el aprendizaje como un cambio en el sistema nervioso que resulta de la experiencia y que origina cambios duraderos en la conducta de los organismos (Morgado-Bernal, 2005).

El aprendizaje puede clasificarse de forma general en aprendizaje no asociativo y aprendizaje asociativo.

El aprendizaje no asociativo es un tipo de aprendizaje en el que se produce un cambio en la conducta como resultado de la experiencia repetida de un único estímulo, o de dos o más estímulos que no están relacionados en el tiempo o en el espacio. En su forma más básica, existen dos tipos de aprendizaje no asociativo: la habituación y la sensibilización.

La habituación consiste en la disminución progresiva y eventual desaparición de una respuesta refleja ante un estímulo inocuo, como consecuencia de su presentación reiterada. Este tipo de aprendizaje se encuentra muy extendido en el reino animal, ya que permite ahorrar energía y tiempo ante estímulos irrelevantes.

Por otro lado, la sensibilización es el incremento más o menos permanente que experimenta una respuesta innata por efecto de la presentación de estímulos moderados de diferente naturaleza cuando son precedidos por otros estímulos intensos o nocivos (Yela Bernabé y Gómez Martínez, 2006).

Las formas más complejas de aprendizaje comprenden la asociación entre dos o más estímulos. En el aprendizaje asociativo se asocian dos o más estímulos con el fin de modificar la conducta de un sujeto. Es decir, el sujeto aprende sobre la relación entre dos estímulos o entre un estímulo y una conducta. El aprendizaje asociativo se clasifica en condicionamiento clásico y condicionamiento operante.

#### **1.6.1. Aprendizaje asociativo**

Como acabamos de mencionar, en el aprendizaje asociativo se asocian dos o más estímulos para conseguir modificar la conducta del sujeto. Este tipo de aprendizaje se clasifica en base a los procedimientos experimentales utilizados para establecer dicho aprendizaje. Se distingue de esta manera, el condicionamiento clásico y el condicionamiento operante.

El condicionamiento clásico fue introducido en el estudio del aprendizaje por el fisiólogo Ivan Pavlov a finales del siglo XX. Partiendo de sus estudios fisiológicos del proceso digestivo de los perros, este fisiólogo ruso formuló uno de los principios básicos

del conductismo: el condicionamiento clásico. Para ello, ideó un experimento en el que cada vez que presentaba la comida a un perro, hacía sonar un diapasón. Las primeras veces, el perro tan sólo salivaba en presencia de la comida. Sin embargo, con el tiempo, la repetición diaria del mismo protocolo logró que el perro salivara jugos gástricos con tan sólo oír el diapasón y antes de que presentara el alimento.

A partir de este experimento se definió el condicionamiento clásico como el mecanismo más simple por el cual los organismos aprenden acerca de las relaciones entre estímulos, y a cambiar su conducta en función de las mismas. La base del condicionamiento clásico es la asociación entre dos estímulos, el estímulo condicionado (EC) (el sonido del diapasón en el caso del experimento de Pavlov), que produce respuestas débiles o no manifiestas, y el estímulo incondicionado (EI) (la comida en el mismo experimento), que normalmente, produce una respuesta potente y manifiesta. Cuando un estímulo condicionado se presenta previamente al estímulo incondicionado, el estímulo condicionado comenzará a provocar una respuesta nueva, llamada respuesta condicionada. Los sucesivos emparejamientos entre el estímulo condicionado y el estímulo incondicionado provocan que el primero se convierta en una señal anticipadora del estímulo incondicionado. Este hecho es esencial para la supervivencia de los individuos, ya que éstos aprenden a predecir los acontecimientos sucedidos en su medio. Para que tenga lugar este tipo de aprendizaje ambos estímulos deben presentar una verdadera relación de contingencia entre ellos (Rescorla y Wagner, 1972).

Para garantizar una atribución causal en el condicionamiento clásico deben darse, entre otras, las siguientes condiciones básicas: i) el estímulo condicionado debe presentarse antes del estímulo incondicionado; ii) La asociación debe repetirse periódicamente; iii) Ambos estímulos deben estar relacionados entre sí; iv) el estímulo incondicionado debe ser muy visible, de manera que se reduzca toda ambigüedad de interpretación.

Dentro del condicionamiento clásico hay que hacer una mención especial al proceso de extinción, ya que ambos conceptos están íntimamente relacionados. La extinción consiste en la disminución de la intensidad o de la probabilidad de que tenga lugar una respuesta condicionada, debida a la presentación reiterada del estímulo condicionado en ausencia del estímulo incondicionado posterior. La extinción es un mecanismo muy importante de adaptación, ya que es un gasto inútil de energía

responder ante estímulos del medio que ya no son significativos para el individuo. Hay que destacar que en la extinción se está aprendiendo algo nuevo; es decir, se aprende que al estímulo condicionado ya no le sigue el incondicionado, por lo que es un proceso activo completamente distinto al olvido.

Dentro del aprendizaje asociativo, también se encuentra el condicionamiento operante. En este tipo de condicionamiento, la respuesta se define en término de una operación o manipulación del ambiente que produce la aparición de la consecuencia, independientemente de la topografía o aspecto concreto de la respuesta. La característica esencial del condicionamiento operante reside en el refuerzo que percibe la conducta operante.

### **1.6.2. Condicionamiento instrumental u operante**

El condicionamiento instrumental u operante es un tipo de aprendizaje asociativo en el cual una respuesta se fortalece, se debilita o se hace más frecuente según sea su consecuencia, positiva o negativa. La expresión condicionamiento operante refleja el hecho de que el animal opera, o actúa, de acuerdo con el ambiente natural o el del laboratorio, para producir un efecto.

Una de las principales figuras en los comienzos del condicionamiento operante es Edward Lee Thorndike, quien enunció en 1898 su ley del efecto, la cual propone que si una respuesta en presencia de un estímulo es seguida por un suceso satisfactorio, la asociación entre el estímulo y la respuesta se fortalece. Si la respuesta, por el contrario, es seguida por un suceso molesto, la asociación estímulo-respuesta se debilita. Thorndike halló esta ley debido a su interés en la inteligencia animal. Y basándose en esto, diseñó un experimento en el que encerraba a gatos en cajas problemas, y éstos debían encontrar la salida con el fin de obtener la comida situada en el exterior.

Thorndike descubrió que existía una correlación negativa entre el número de veces que el animal había escapado de la jaula y la cantidad de tiempo que invertía en hacerlo; es decir, cuantos más ensayos había realizado, menos tiempo tardaba en escapar. Según esta ley los animales aprenden una asociación entre la respuesta y los estímulos presentes cuando se ejecuta la respuesta. La consecuencia de la respuesta no es un elemento que forme parte de la asociación. La consecuencia satisfactoria o

molesta, simplemente sirve para fortalecer o debilitar la asociación entre la respuesta y el estímulo. La ley del efecto implica un aprendizaje estímulo-respuesta. Según Thorndike, la ley del efecto no es más que la aplicación del principio de selección natural aplicado al comportamiento específico de un sujeto.

El psicólogo Burrhus Frederic Skinner fue el primero en proponer este tipo de condicionamiento en sus estudios. Skinner define el condicionamiento operante como el proceso mediante el cual se aumenta o disminuye la probabilidad de dar una respuesta según el efecto (llamado refuerzo) positivo o negativo que provoque. Ante un estímulo se produce una respuesta voluntaria, la cual, puede ser reforzada de manera positiva o negativa provocando que la conducta operante, en consecuencia, se fortalezca o debilite. Skinner ideó la caja que lleva su nombre, en 1938, con la función de permitir la repetición de la respuesta instrumental (pulsar una palanca) por parte del animal una y otra vez sin restricciones.

Si Pavlov partía en su investigación de las respuestas innatas y trataba de estudiar cómo se pueden condicionar, Skinner centró su atención en las respuestas voluntarias (y no innatas) que realiza el sujeto de experimentación. Siguiendo el camino abierto por Thorndike y su ley del efecto, Skinner entendió que se debe identificar qué factores ambientales influyen en la conducta. La recompensa y el castigo pasaron a ocupar un lugar esencial en sus investigaciones. Skinner guió sus estudios hacia el condicionamiento instrumental u operante, tratando de reforzar o eliminar las respuestas deseadas.

Un concepto básico en el condicionamiento operante es la tasa de respuesta, que no es más que la observación del aumento de la frecuencia de la respuesta a lo largo de las sesiones de reforzamiento, a la vez que disminuye la tasa de respuestas no reforzadas. Skinner propuso utilizar la tasa de aparición de una conducta operante como medida de la probabilidad de respuesta. Las respuestas más probables ocurren con frecuencia y muestran una tasa alta, mientras que las respuestas improbables ocurren esporádicamente y muestran una tasa baja.

Así, se puede deducir que en el condicionamiento operante, la figura del reforzamiento es esencial para que la conducta sea aprendida. Así, los refuerzos son estímulos que al ser presentados casualmente tras la emisión de una respuesta, aumenta o disminuye, según su naturaleza positiva o negativa, la probabilidad de emisión de la

misma. Su presentación depende de la emisión de la respuesta deseada (Yela Bernabé y Gómez Martínez, 2006).

Para el control de una conducta no basta con haber elegido el reforzador apropiado, sino que, además, se deberán tener en cuenta factores importantes, como son la inmediatez, la cantidad de refuerzo, condiciones, probación y exposición, entre otros, que ayudarán a acrecentar la efectividad del refuerzo.

### **1.6.3. Memoria a corto y largo plazo**

En función de cuánto tiempo se retenga la información adquirida mediante el aprendizaje podemos distinguir la memoria a corto plazo o la memoria a largo plazo.

El término memoria a corto plazo se refiere a la memoria que utilizamos para retener dígitos, palabras o nombres durante un periodo breve de tiempo. Se denomina también memoria de trabajo (Working memory). Es un sistema que permite mantener activada y accesible una cantidad limitada de información durante un corto espacio de tiempo, mientras se manipula mentalmente esa u otra información” (Ruiz-Vargas, 1980). En este tipo de memoria el individuo maneja la información a partir de la cual está interactuando con el ambiente.

Los modelos generales de memoria plantean que la información procedente de los sentidos, tras pasar brevemente por el almacén sensorial y antes de almacenarse en la memoria a largo plazo (MLP) es transferida a la memoria a corto plazo (MCP). La MCP sería un almacén de retención a corto plazo, pero lo que es más importante, se la considera responsable de los procesos de codificación de la información, aunque también de la recuperación, pues es en ella donde se activa la información procedente de la MLP. El grueso de los primeros estudios se centró en analizar su capacidad, duración, codificación, recuperación y transferencia de información a la MLP. Así pues, junto a las funciones de mero almacenamiento se le atribuyen funciones ejecutivas y de control de la información. Son estas últimas funciones las que, en los ochenta (Baddeley, 1986) y a partir de la propuesta de Baddeley y Hitch (1974), cobran cada vez más importancia, hasta el punto de que hoy memoria a corto plazo es prácticamente sinónimo de memoria operativa (Santiago y cols., 2006). Este cambio paradigmático lleva a considerar la MCP ya no como un sistema unitario de almacenamiento sino como una memoria de trabajo de

múltiples componentes, relacionados con otros procesos cognitivos como el razonamiento, la comprensión y el aprendizaje (Manzanero, 2008).

La memoria a corto plazo puede convertirse en memoria a largo plazo tras varias repeticiones. Con la memoria a largo plazo podemos retener una gran cantidad de información durante un tiempo indefinido. Esta memoria es estable, duradera y poco vulnerable a interferencias (Morgado-Bernal, 2005).

La memoria a largo plazo se clasifica en dos tipos diferentes de memoria, la memoria implícita y la explícita, la cual se subdivide a su vez en memoria episódica y semántica.

La memoria implícita o de procedimiento sirve para almacenar información acerca de procedimientos y estrategias que permiten interactuar con el medio ambiente, pero cuya puesta en marcha tiene lugar de manera inconsciente o automática, resultando prácticamente imposible su verbalización. Este tipo de memoria puede considerarse un sistema de ejecución, implicado en el aprendizaje de distintos tipos de habilidades que no están representadas como información explícita sobre el mundo. Por el contrario, éstas se activan de modo automático, como una secuencia de pautas de actuación, ante las demandas de una tarea. Consisten en una serie de repertorios motores (escribir) o estrategias cognitivas (hacer un cálculo) que llevamos a cabo de modo inconsciente.

El aprendizaje de estas habilidades se adquiere de modo gradual, principalmente a través de la ejecución y la retroalimentación que se obtenga; sin embargo, también pueden influir las instrucciones (sistema declarativo) o la imitación (mimetismo). El grado de adquisición de estas habilidades depende de la cantidad de tiempo empleado en practicarlas, así como del tipo de entrenamiento que se lleve a cabo (Manzanero, 2008).

Por otro lado, la memoria explícita o declarativa es aquella en la que se almacena información sobre hechos. Este tipo de memoria contiene información referida al conocimiento sobre el mundo y sobre las experiencias vividas por cada persona. Se clasifica en memoria episódica, que retiene conocimientos y experiencias personales, y en memoria semántica, que es la que se refiere a los hechos (Kandel y col., 2000). La memoria semántica trabaja con información conceptual que tiene referencias cognitivas sobre hechos o sucesos genéricos y sobre conocimiento general. Por definición, la información semántica es acontextual o no autobiográfica. Son nuestros “conocimientos”.

La memoria semántica da cuenta de un almacén de conocimientos acerca de los significados de las palabras y de las relaciones entre estos significados, y constituye una especie de diccionario mental, mientras que la memoria episódica representa eventos o sucesos que reflejan detalles de la situación vivida y no solamente el significado (Manzanero, 2008).

El objetivo último del aprendizaje es la adquisición de un procedimiento comportamental automatizado, es decir, una memoria implícita (Kandel y cols., 2000). En ocasiones, la retención transitoria o permanente de datos y rutinas conscientes puede asistir y facilitar al proceso de adquisición, automatización y consolidación de la memoria implícita (Pascual-Leone y cols., 1994; Clark y Squire, 1998; Manns y cols., 2000).

En algunos casos, tras un determinado número de repeticiones, las pruebas motoras comportamentales, destinadas a determinar o cuantificar una conducta, pueden ser consideradas pruebas de aprendizaje motor.

Por otra parte, las acciones motoras voluntarias complejas están representadas en la corteza cerebral, mientras que las acciones más simples, sobre todo las de tipo reflejo y automático, lo están en estructuras subcorticales (ganglios basales, tronco del encéfalo y médula espinal). Con el aprendizaje, la conducta deja de ser voluntaria y se va haciendo automática e implícita. Así, cabe pensar que con la práctica, la actividad subcortical aumenta conforme la cortical disminuye.

## **1.7. NOCICEPCIÓN**

La percepción del dolor y los mecanismos que ésta pone en marcha deben ser entendidos dentro del sistema general de defensa del individuo frente a las agresiones del medio. Una adecuada respuesta por parte del sistema nociceptivo a un estímulo potencialmente lesivo permite evitar graves daños sobre al individuo y por tanto ser algo positivo cara a la supervivencia.

Las regiones cerebrales involucradas en la modulación intrínseca del estímulo doloroso incluyen a la corteza somatosensorial, el hipotálamo, el mesencéfalo, al sustancia gris periacueductal y el rafe magnus.



Desde estas estructuras centrales las fibras descienden por el cordón dorsolateral a la médula espinal, enviando proyecciones a las láminas I y V. La activación del sistema analgésico descendente tiene un efecto directo en la integración y el paso de la información nociceptiva en el asta posterior. El bloqueo del cordón dorsolateral aumenta la respuesta de las neuronas nociceptivas activadas por el estímulo doloroso. El sistema descendente tiene tres componentes mayores, interrelacionados funcionalmente: i) el sistema opioide; ii) el sistema serotoninérgico; y iii) el sistema noradrenérgico.

El sistema opioide, integrado por los precursores opiáceos y sus respectivos péptidos, está presente en la amígdala, el hipotálamo, la sustancia gris periacueductal, el rafe magnus y el asta posterior.

En el sistema serotoninérgico, las neuronas del rafe magnus contienen serotonina y envían sus proyecciones a la médula por el cordón dorsolateral. El bloqueo farmacológico o la lesión del rafe magnus puede reducir los efectos de la morfina y la administración de serotonina en la médula produce analgesia.

Las neuronas noradrenérgicas se proyectan desde el Locus coeruleus y otras células noradrenérgicas hasta el asta posterior, a través del cordón dorsolateral. La estimulación de estas áreas produce analgesia, al igual que la administración directa o intratecal de agonistas de los receptores  $\alpha_2$  (Serrano-Atero, 2002).

Los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos se encuentran ampliamente distribuidos tanto en el SNC (MacDonald y cols., 1995) como a nivel periférico (Handy y cols., 1993). Se ha demostrado que participan en un amplio espectro de funciones fisiológicas que incluyen la inhibición de la liberación de neurotransmisores, la regulación de la presión arterial, el control de la liberación de insulina, lipólisis, sedación, regulación de la función renal y de funciones cognitivas y de comportamiento (Small y cols., 2001). Los efectos a nivel celular de la activación de los adrenoreceptores  $\alpha_2$ , que se acoplan a múltiples efectores mediante las proteínas Gi/Go, incluyen inhibición de adenilato ciclasa, activación de los canales de  $K^+$  mediados por receptor, inhibición de los canales de  $Ca^{2+}$  voltaje-dependientes, activación de la fosfolipasa C, estimulación de la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular y estimulación de las MAP-quinasas (Saunders y Limbird, 1999).

La administración en la médula espinal de agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos produce una analgesia dosis-dependiente y mediada por diferentes mecanismos de acción, entre los

cuales se encuentran la modulación de la liberación de neurotransmisores y la hiperpolarización de neuronas (Williams y cols., 1985; Bean, 1989; Lipscombe y cols., 1989; Takano y cols., 1993; Eisenach y cols., 1996). Numerosos estudios sugieren que los agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos son muy efectivos en la modulación nociceptiva, siendo incluso más activos en situaciones de sensibilización inducida por inflamación (Hylden y cols., 1991; Idänpään-Heikkilä y cols., 1994; Stanfa y Dickenson, 1994; Mansikka y Pertovaara, 1995). Esto se relaciona con un aumento de la densidad de receptores adrenérgicos en láminas I y II de la médula espinal (Brandt y Livingston, 1990) y con un incremento de la movilización de noradrenalina en artritis (Weil-Fugazza y cols., 1986).

La modulación del dolor inflamatorio mediante el sistema  $\alpha_2$ -adrenérgico no se limita únicamente a una acción directa sobre neuronas de la médula espinal. Los mecanismos de control de la inhibición descendente del dolor se activan en el dolor inflamatorio (Herrero y Cerveró, 1996; Ren y Dubner, 1996) y, entre estos, el SNA se considera como uno de los más importantes con origen en el tronco del encéfalo (Peng y cols., 1996; Cui y cols., 1999) (Molina-Camacho, 2007)

## ***2. OBJETIVOS***



Partiendo de la hipótesis de que los ratones modelo tratados con ácido retinoico, o con clonidina y los ratones mutantes EAR2 tienen reducida la liberación de noradrenalina a nivel troncoencefálico y cortical en la etapa postnatal, y considerando que esta etapa es fundamental en el establecimiento de proyecciones y conexiones permanentes entre el tronco del encéfalo y las estructuras corticales en el adulto, el **objetivo general** del presente trabajo consiste en estudiar de qué modo el sistema noradrenérgico controla en el neonato funciones vitales como respuestas motoras reflejas y respiratorias y cómo participa en el desarrollo postnatal del sistema nervioso y en el establecimiento de conexiones funcionales con la corteza cerebral. Para conseguir este propósito, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Seleccionar tres modelos experimentales con distintas alteraciones en el sistema noradrenérgico que permitiese analizar las consecuencias de las deficiencias de éste en las distintas pruebas realizadas.
2. Estudiar los cambios postnatales en el patrón respiratorio de los grupos experimentales durante la primera semana de vida.
3. Determinar si los ratones con el sistema noradrenérgico afectado presentan una alteración en el desarrollo postnatal.
4. Determinar el efecto de las distintas alteraciones del sistema noradrenérgico sobre la actividad motora postnatal y adulta.
5. Estudiar las posibles deficiencias en las vías relacionadas con la memoria y el aprendizaje postnatal y adulto, a través de distintas pruebas comportamentales que implican la participación de distintos sistemas corticales.
6. Analizar el efecto sobre la nocicepción de los grupos experimentales.



### ***3. MATERIALES Y MÉTODOS***





### 3.1. SUJETOS EXPERIMENTALES

#### 3.1.1. Sujetos recién nacidos

En los experimentos realizados en ratones recién nacidos se usaron machos y hembras de las cepas CD1 y C57BL/6, dentro de los cuales se establecieron diferentes grupos experimentales. Los ratones se criaron en el animalario del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD, Sevilla, España), donde se realizaron los experimentos.

Las camadas permanecieron con sus madres en jaulas independientes (20,5 × 20,5 × 14 cm) con acceso libre a la comida y al agua durante todo el periodo de experimentación. La edad de manipulación estuvo comprendida entre el primer y el vigésimo día postnatal. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz/ oscuridad de 12/ 12 horas y en unas condiciones de temperatura ( $21^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ ), humedad ( $50\% \pm 7\%$ ) y ventilación constantes. Todos los experimentos se realizaron durante el periodo de luz (8:00 – 20:00 horas).

Diariamente, las crías se separaron de la madre y se sometieron a las diferentes pruebas que constituyen el experimento. Entre las distintas pruebas realizadas, los ratones se dejaron descansar en una cámara atemperada. Tras finalizar la serie experimental, los individuos fueron devueltos con su madre.

En los experimentos realizados con la cepa CD1, todos los grupos tuvieron una n experimental de 20 individuos para la prueba de *Actividad respiratoria*, el *Actímetro*, la prueba de analgesia con la *Placa caliente* y el *Reconocimiento de objetos*. Por otro lado, para la *batería de Fox* la n experimental fue de 35 animales para cada uno de los grupos de la cepa CD1. Dichos grupos se presentan a continuación:

Grupo Control. De forma crónica, 30 minutos antes de las pruebas se les administró por vía subcutánea suero fisiológico (35 µg/kg del peso del animal, para igualarlo así con la administración del fármaco clonidina).

Grupo tratado con ácido retinoico (RA). El ácido retinoico (Sigma, R2625) se aplicó por vía oral a las hembras en el día 7,5 de gestación (E 7,5) (la mañana en la que se encuentra el tapón vaginal se consideró el día 0,5). La dosis utilizada fue de 0,5 mg/kg del peso materno, disuelto en DMSO, en un volumen de aceite de oliva final de 200 µl.

(Guimarães y cols., 2007). Así, a los 19 días obtuvimos las camadas tratadas con ácido retinoico. A igual que en el caso de los ratones control, 30 minutos antes de las pruebas se les administró por vía subcutánea 35 µg/kg del peso del animal de suero fisiológico.

Grupo tratado con clonidina (CLO). Diariamente, 30 minutos antes de la realización de las pruebas, se administró de forma crónica y por vía subcutánea una dosis de 35 µg/kg del peso del animal de clonidina (Sigma, C7897).

En lo referente a los grupos pertenecientes a la cepa C57BL/6, la n experimental fue de 20 animales para cada una de las pruebas experimentales. Los grupos fueron los siguientes:

Grupo silvestre (WT). Se correspondieron con los animales control del experimento.

Grupo mutante heterocigoto (WT/ EAR2). Sólo llevaban la mutación knock-out en una de las copias del gen EAR2.

Grupo mutante homocigoto EAR2 (EAR2). Fueron los animales que portaban la mutación knock-out en el gen EAR2 en ambas copias.

### 3.1.2. Sujetos adultos

Para los experimentos realizados en animales adultos, se usaron ratones machos de la cepa C57BL/6, los cuales en el momento de la serie de pruebas tenían entre 3 y 6 meses de edad y pesaban entre 28 – 35 gramos. Los animales procedían del animalario del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Sevilla, España.

Durante una semana, desde la recepción de los animales hasta el momento de las pruebas, no se realizó ningún experimento en los animales. Esto se hizo con el fin de que se habituaran a las condiciones del animalario del edificio de Servicios Centrales de Investigación (SCI), donde se realizaron los experimentos.

Durante el periodo de habituación y experimentación, cada animal permaneció en una jaula individual de dimensiones 6,5 × 9 × 5,5, cm, sometidos a un ciclo de 12 horas de luz – 12 horas de oscuridad y en unas condiciones constantes de temperatura (21° ± 1° C), humedad (50% ± 7%) y ventilación. La comida y bebida estuvieron disponibles *ad libitum*, excepto durante la prueba de *Condicionamiento instrumental*, en la que se les

sometió a restricción calórica. Todos los experimentos se realizaron durante el periodo de luz (8:00 – 20:00 horas).

Los ratones adultos de la cepa C57BL/6 se dividieron en tres grupos con una *n* experimental de 15 animales cada uno. Al igual que el estudio realizado en ratones neonatos, el primer grupo fue el de los ratones silvestres (WT), que se usaron como control del experimento; el siguiente fue el de los animales heterocigotos (WT /EAR2); y finalmente, los sujetos mutantes EAR2 (homocigotos EAR2). Todos ellos estuvieron sometidos a las mismas condiciones ambientales desde su nacimiento hasta la realización de las pruebas.

Los estudios fisiológicos y de comportamiento realizados tanto en animales neonatos como adultos, se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación de la Unión Europea (2003/65/CE) y de España (BOE 252/34367-91, 2005) para el uso de animales de laboratorio en experimentos crónicos. Los experimentos fueron aprobados por el Comité Ético local de la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla, España).

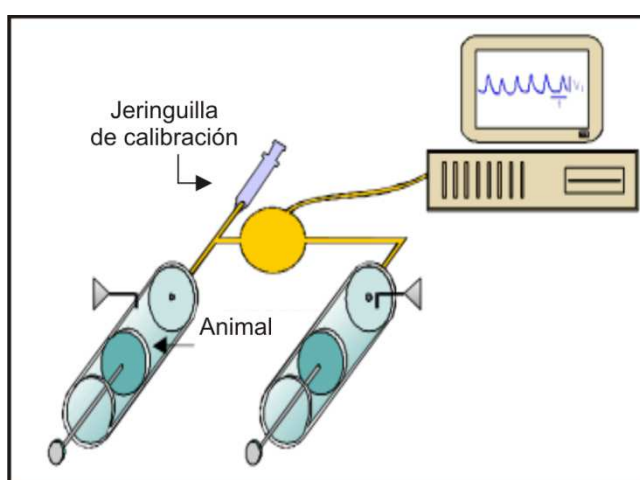
### **3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Como se propuso en los objetivos del trabajo, se diseñó una serie de experimentos para estudiar, desde un punto de vista fisiológico y comportamental, la influencia del sistema adrenérgico en el desarrollo postnatal y en el control y la ejecución de distintas pruebas reflejas, motoras y conductuales, tanto en los animales neonatos como en los adultos.

#### **3.2.1. Estudio de la actividad respiratoria**

Durante los siete primeros días de vida postnatal se registró la actividad respiratoria de los animales neonatos. Para ello, se usó la técnica de plestimografía de cuerpo completo (Drobaugh y Fenn, 1955). Ésta consistió en una cámara de 60 ml, la cual estaba cerrada herméticamente y conectada a una cámara de referencia. Ambos compartimentos estaban conectados a un transductor diferencial de presión (Validyne DP 103- 14), el cual, mediante un modulador de ondas (Validyne CD15) enviaba los registros al ordenador a través de una tarjeta digitalizadora (National Instruments). Mediante el empleo del programa informático WinWCP (Strathclyde University) se registraron y estudiaron las distintas variables respiratorias.

Tras medirle la temperatura al animal, éste se introdujo en el plestimógrafo durante dos minutos. Para evitar la posible pérdida de calor en el ratón, la cámara se colocó bajo un foco de luz indirecta, calentando el ambiente. Durante los dos minutos de realización de la prueba se midió la temperatura y la humedad del ambiente, así como el valor de la presión atmosférica. En dicho tiempo se inyectó a la cámara en la que estaba el animal un volumen de aire conocido (5 µl) como calibración del cambio en mV que se obtuvo en el registro.



**Figura 3.1. Plestimógrafo.** Ilustración del aparato de medición de la actividad respiratoria. Nótese como las dos cámaras de plestimografía están unidas entre ellas por medio de una sonda de presión, representada en color amarillo y a un ordenador, donde se registró la actividad respiratoria. Se señala, también, la jeringuilla de calibración, por la que se introdujo un valor conocido de aire (5 µl) en la cámara donde estaba colocado el animal, calibrándose así el cambio producido, en mV, en el registro respiratorio analizado.

Por medio de los registros obtenidos con el programa WinWCP, se estudiaron las distintas variables respiratorias durante el periodo comprendido entre el tercero y sexto día postnatal. Se partió siempre de fragmentos del registro en los que los animales no se movían y mostraban respiración pausada.

A partir de la amplitud de cada ciclo respiratorio, se obtuvo el promedio correspondiente al volumen tidal ( $V_t$ ) para cada uno de los animales de los grupos experimentales, en los distintos días postnatales, por medio de la siguiente fórmula

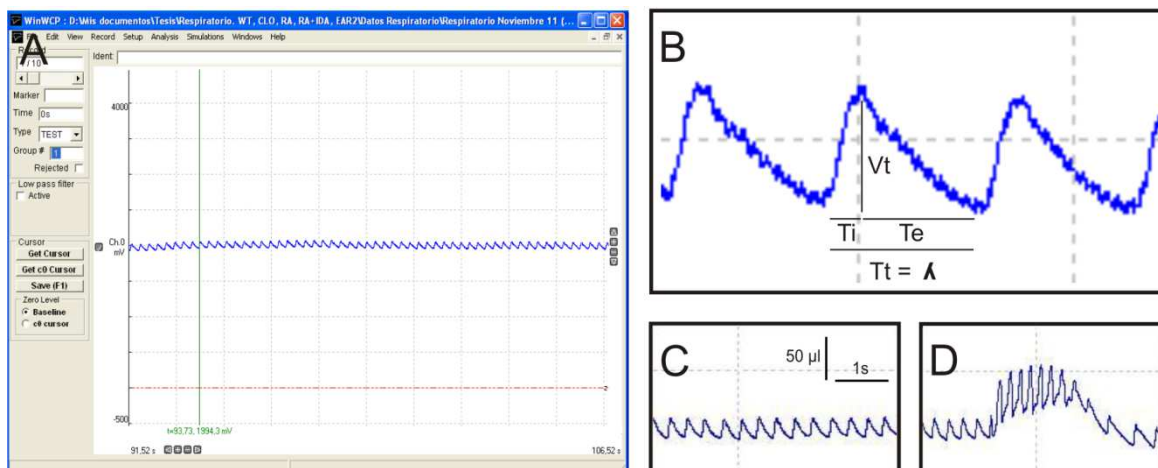
matemática: 
$$V_t = \frac{(P_t / P_k) V_k (T_r \times (P_b - P_c))}{T_r (P_b - P_c) - T_r (P_b - P_r)}$$
, donde  $V_k$  es el volumen inyectado en la

calibración (5 µl);  $P_t$  es la amplitud de la onda respiratoria (mV);  $P_k$  hace referencia a la amplitud de onda que produce la inyección de 5 µl de aire (mV);  $T_r$ , corresponde a la

temperatura del individuo ( $^{\circ}\text{K}$ );  $T_c$  es la temperatura del recinto ( $^{\circ}\text{K}$ );  $P_b$  representa la presión atmosférica (mmHg);  $P_c$  indica la presión de saturación del vapor de agua a temperatura ambiente; y finalmente,  $P_r$  representa la presión de saturación de vapor de agua a la temperatura corporal (mmHg).

Este dato, de cada animal y día, se dividió por su peso, como medida de normalización para evitar que las diferencias observadas en el  $V_t$  sean debidas a la diferencia de tamaño. De una forma similar, se analizó la frecuencia respiratoria, que corresponde al número de ciclos por minuto, para cada uno de los grupos. Como complemento a estas dos variables, se analizó el volumen por minuto ( $V_m$ ), que resultó del producto de la amplitud (en  $\mu\text{l}$ ) por la frecuencia respiratoria, dando como resultado el volumen de aire respirado por el animal por minuto.

El último parámetro analizado fue la aparición de episodios de hiperpnea (HEB). Estos episodios, cuya duración fue de 1-2 segundos, se representaron como un cambio en el patrón respiratorio que se caracterizó por la sucesión de ciclos respiratorio de alta frecuencia y mayor amplitud que un ciclo respiratorio normal. Estos episodios, la mayor parte de las veces, eran seguidos de un breve periodo (1-2 segundos) de apnea (figura 3.2.D).



**Figura 3.2. Análisis de la actividad respiratoria.** (A) Registro respiratorio obtenido del programa WinWCP. (B) Registro ampliado. Se ilustra las distintas variables analizadas para evaluar la actividad respiratoria de cada grupo experimental. Se representa el volumen tidal ( $V_t$ ), que corresponde con el volumen de aire inspirado en cada ciclo. Se muestra el tiempo o longitud total del ciclo respiratorio ( $T_t$ ), equivalente al parámetro de longitud de onda ( $\lambda$ ), a partir del cual se calculó la frecuencia respiratoria ( $f = 1/\lambda$ ; donde  $f$  es la frecuencia y  $\lambda$  la longitud de la onda). También se indica en la ilustración el tiempo de inspiración ( $T_i$ ) y el tiempo de espiración ( $T_e$ ) del animal. (C) Registro respiratorio considerado como normal. (D) Representación de los episodios de hiperpnea (HEB). Nótese como aumentó la frecuencia y amplitud de las ondas respiratorias.

### 3.2.2. Batería de Fox

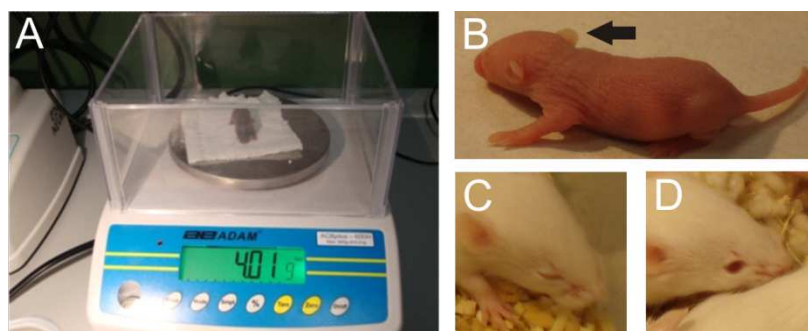
Con el objetivo de estudiar las posibles anomalías en el desarrollo de los ratones tras las distintas alteraciones en el sistema adrenérgico, se realizó una serie de pruebas englobadas en la *Batería de Fox* (Tamashiro y cols., 2000; Dierssen y cols., 2002). Una vez que los animales salieron de la cámara de plestimografía, y tras recuperarse de la prueba por espacio de cinco-diez minutos, se realizó la batería de pruebas. Esta serie se realizó diariamente desde el primer al décimo cuarto día postnatal de los sujetos experimentales. Se examinaron las distintas etapas del desarrollo de los ratones junto con su conducta motora.

#### 3.2.2.1. Marcadores de desarrollo

Diariamente se observó la aparición y evolución de cada uno de los marcadores de desarrollo pertenecientes a la batería de Fox.

El primero de estos marcadores fue el peso del animal. Se realizó un seguimiento diario del peso del ratón, evaluándose las posibles deficiencias alimenticias. Se anotaron los valores obtenidos, en gramos, con una balanza de precisión de dos decimales.

A continuación se observó la *separación de las orejas* y la *apertura de ojos* de los sujetos experimentales, anotando en ambos casos la primera vez que el animal mostró el marcador.



**Figura 3.3. Marcadores de desarrollo.** (A) Balanza utilizada en la medida del peso. (B) Muestra de un animal con la oreja separada. (C) y (D) Representación de un ratón mostrando la apertura de ojos.

#### 3.2.2.2. Reflejo de succión

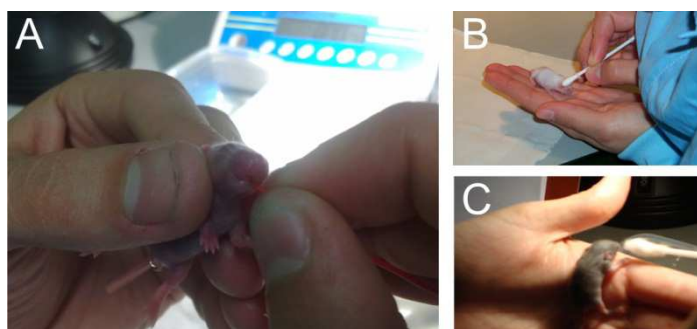
Durante los cinco primeros días postnatales se introdujo en la boca del sujeto, como estímulo peribuccal, un fino catéter de plástico. A continuación, durante 30 segundos, se contabilizó el número de veces que el animal masticaba.

#### 3.2.2.3. Estimulación de las vibrisas (Rooting)

Para evaluar la respuesta motora ante un estímulo táctil, con la ayuda de un bastoncillo de algodón se frotó suavemente las vibrisas de los ratones, estimulando así éstas. Se observó si el animal giraba la cabeza hacia el lado del que procedía el estímulo, anotando este comportamiento como una respuesta positiva o exitosa.

#### 3.2.2.4. Estimulación de las orejas

Una vez separadas las orejas, se midió la respuesta refleja ante un estímulo en las mismas. Para ello, al igual que en el caso anterior, se usó un bastoncillo de algodón para frotar suavemente el borde de la oreja. El movimiento rápido de ésta se dio como respuesta positiva.



**Figura 3.4. Pruebas Batería Fox.** Representación, de tres de las pruebas correspondientes a la batería de Fox. **(A)** Reflejo de succión. **(B)** Estimulación de orejas. **(C)** Estimulación de vibrisas.

#### 3.2.2.5. Reflejo de giro (Righting)

Durante los siete primeros días postnatales se realizó la prueba del *Reflejo de giro*. Se colocó al ratón en posición decúbito supino y tras esto, se contabilizó el tiempo en el que el animal tardaba en darse la vuelta, con las cuatro patas apoyadas en la superficie de trabajo. El tiempo máximo de la prueba fue 30 segundos, anotando esta latencia en los animales que tardaron más tiempo en realizar la prueba o en aquellos que no llegaron a mostrar este reflejo.

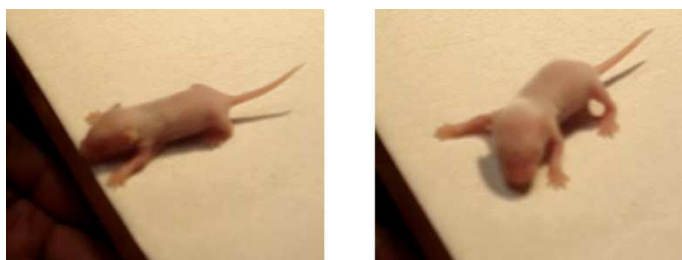


**Figura 3.5. Reflejo de giro.** Representación de una sesión típica de la prueba de *Reflejo de giro*. Al principio se puso al animal decúbito supino (foto de la izquierda), midiendo, a continuación, la latencia empleada en darse la vuelta sobre sí mismo apoyado en sus cuatro patas, como se muestra en la imagen de la derecha.

#### 3.2.2.6. Vértigo

Al igual que en el caso anterior, el periodo de realización de esta prueba fue del primero al séptimo día postnatal. En este caso, se colocó al animal en el borde de la mesa con las patas delanteras y la cabeza fuera del borde, con la intención de que percibiese el vacío. Se midió la latencia empleada por cada uno de los sujetos en retroceder y girar 90° desde la posición inicial. Al igual que en la prueba del *Reflejo de giro*, el tiempo máximo de la prueba fue 30 segundos.





**Figura 3.6. Vértigo.** En la fotografía de la izquierda se presenta un ratón colocado en el borde de la mesa, provocándole así sensación de vacío. En la fotografía de la derecha se observa como el animal se retiró del borde, efectuando un giro de 90° aproximadamente.

### 3.2.2.7. Geotaxia negativa

Con idea de verificar el estado funcional del sistema vestibular y la coordinación motora, como complemento a las pruebas de *Reflejo de giro* y *Vértigo*, se realizó la prueba de *Geotaxia negativa*. Se colocó al ratón en una superficie inclinada 30° sobre el plano horizontal, con la cabeza orientada hacia abajo. A continuación, se contabilizó el tiempo en el que el animal tardaba en girarse 180° sobre sí mismo, modificando su postura inicial. Al igual que en los dos casos anteriores, la prueba de *Geotaxia negativa* se realizó durante los siete primeros días postnatales y el tiempo máximo de ésta fue 30 segundos, apuntando esta latencia en los ratones que tardaron más tiempo en realizar la tarea o en aquellos que se caían del plano inclinado.



**Figura 3.7. Geotaxia negativa.** En la fotografía de la izquierda se presenta al animal colocado boca abajo en el plano inclinado de 30°. A continuación se muestra la evolución de esta prueba, observando en la fotografía de la derecha al ratón colocado boca arriba, habiendo efectuado un giro de 180°.

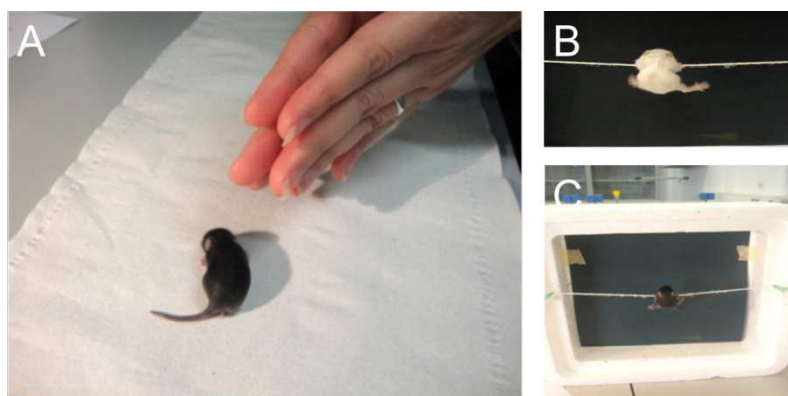
### 3.2.2.8. Respuesta de sobresalto (Startle)

El *Reflejo de sobresalto* consistió en una respuesta sensorio-motora que se caracterizó por la contracción de los músculos de los ojos (parpadeo), el cuello y las extremidades ante un estímulo acústico fuerte e imprevisto.

A partir del séptimo día postnatal y hasta la presentación del reflejo por parte del animal, se realizó un estímulo acústico, dando una palmada, a 25 centímetros de distancia. Si el animal se sobresaltaba se daba la prueba por exitosa.

### 3.2.2.9. Suspensión

En el periodo comprendido entre el séptimo y el décimo cuarto día postnatal, se realizó la prueba de suspensión. Se colocó al sujeto suspendido en una cuerda tensada a 20 centímetro de la superficie de trabajo. A continuación se midió la latencia de permanencia del ratón sujetado a la cuerda con sus patas delanteras.



**Figura 3.8. Pruebas Batería Fox II.** Representación, de tres de las pruebas correspondientes a la batería de Fox. **(A)** Representación de la prueba del Reflejo de sobresalto. **(B)** y **(C)** Imágenes de dos animales distintos suspendidos en una cuerda situada a 20 cm. aproximadamente de la superficie de trabajo. Nótese como los animales están sujetos de sus patas delanteras.

Para las pruebas englobadas en la batería de Fox, se anotó el primer día que los animales realizaron cada una de ellas, mostraron los reflejos analizados (Estimulación de las vibrisas, Estimulación de las orejas y Respuesta de sobresalto) y/o presentaron los distintos marcadores de desarrollo (Separación de orejas, Apertura de ojos). También se midió la latencia de realización, en segundos, de aquellas tareas que se realizaron durante días sucesivos (Reflejo de giro, Vértigo, Geotaxia negativa y Suspensión) para poder analizar su evolución temporal.

Para el Reflejo de succión, se contó el número de veces que los animales masticaban durante 30 segundos. Además, se hizo un seguimiento del peso de los animales durante el periodo experimental.

### 3.2.3. Pruebas de comportamiento motor

Con el fin de evaluar las posibles anomalías en las habilidades motoras de los distintos grupos de ratones se realizaron una serie de pruebas motoras.

#### 3.2.3.1. Actímetro o campo abierto

Mediante la prueba del *Campo abierto* se midió la capacidad exploratoria y la actividad motora en general. El actímetro (Cibertec, S.A.), constó de una jaula de metacrilato (35 x 35 x 25 cm.) rodeado de un bastidor con haces infrarrojos en los ejes horizontales X e Y (16 x 16) (ver figura 3.9.A y B). Cuando los animales cortaban estos rayos, mandaban información de la actividad y la localización bidimensional. Esta información fue cuantificada por un programa informático específico (MUX\_XYZ16L), mostrando la actividad por minuto (número de haces cortado por minuto) para cada sujeto experimental.

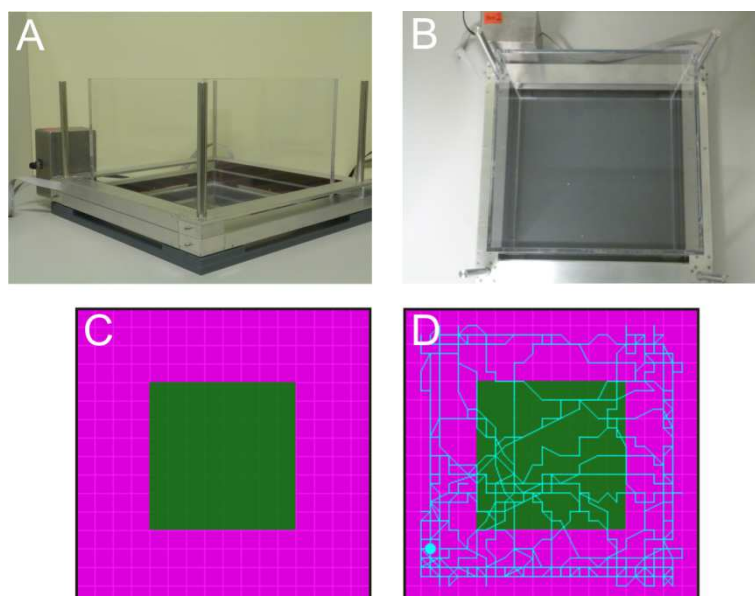
En la realización de esta prueba, se introdujo el animal durante 10 minutos en el actímetro, registrándose así su actividad. Pasado este tiempo se devolvió a su jaula.

La prueba de *Campo abierto* se realizó en los animales neonatos una vez que abrieron los ojos (P16-P18). Y también se llevó a cabo en los ratones adultos de la cepa C57BL/6 para los tres grupos experimentales (silvestre, heterocigoto y mutante EAR2). En ambos casos, los ratones realizaron la prueba del actímetro por primera vez.

A partir del programa informático MUX\_XYZ16L, se registró la actividad de los animales durante los 10 minutos de duración de la prueba.

Se realizó un registro acumulativo de la actividad exploratoria de los animales. Para ello, se analizó el número de haces infrarrojos cortados por los sujetos experimentales a los 2, 4, 5, 6, 8 y 10 minutos de la realización de la prueba.

Además, a partir del mismo programa, también se analizó el tiempo, en porcentaje, que el animal permaneció en el centro del espacio con respecto al total del tiempo activo. (ver figura 3.9.D).



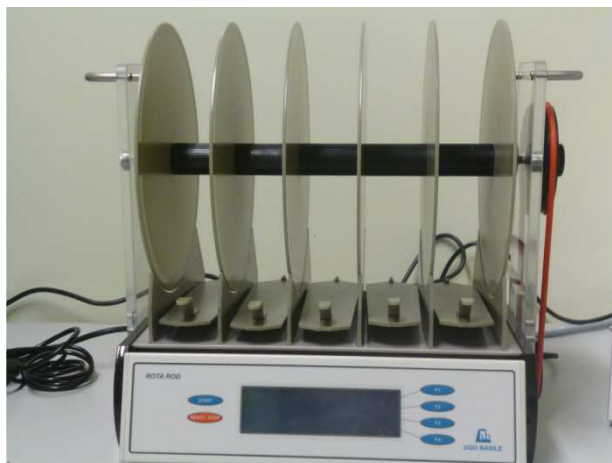
**Figura 3.9. Actímetro.** (A) y (B) Imágenes con distintas perspectivas del aparato del actímetro. (C) Imagen obtenida del programa MUX\_XYZ16L (Cibertec, S.A.). El color rosa muestra la periferia del actímetro frente al centro de éste representado en color verde. (D) Imagen similar a la anterior, en la que además del centro y la periferia, se muestra en azul el recorrido efectuado por el animal durante 5 minutos de realización de la prueba.

### 3.2.3.2. Cilindro rotatorio o Rotarod

Con la prueba del *Rotarod* se evaluó el comportamiento y el aprendizaje motor de los ratones silvestres, heterocigotos y mutantes EAR2 adultos. Esta prueba requiere coordinación motora y equilibrio, además de fuerza muscular.

Para realizar la tarea se colocó al animal, durante 5 minutos, sobre un cilindro rotatorio (Ugo Basile, modelo 7650), en el sentido contrario a la dirección del movimiento del cilindro. El *Rotarod* consta de un sistema de ejes (2 poleas) que mueven una correa. Ésta transmite la velocidad elegida a un eje de rodillos cilíndricos, sobre los que se colocaron a los ratones. Los animales trataban de resistir sin caerse, obligándolos a avanzar conforme giraba el rotor. Cuando el animal se cayó, se contabilizó el tiempo, anotando el número de caídas y el valor de la latencia de ésta, si trataba de la primera. Tras esto, se volvió a colocar al animal sobre el rotor, reanudando el cronómetro hasta llegar a los 5 minutos. Esta prueba se repitió durante tres días seguidos.

La velocidad de rotación en nuestro experimento fue de 2 a 20 rpm.



**Figura 3.10. Rotarod.** Fotografía del Rotarod utilizado en la prueba. Se observa como podían realizar la prueba hasta 5 animales a la vez.

### 3.2.4. Memoria y aprendizaje

Para establecer las posibles deficiencias en la memoria y el aprendizaje se realizó una batería de pruebas relacionadas.

#### 3.2.4.1. Evitación pasiva

Se estudió si la aplicación de un estímulo aversivo tenía algún efecto en los animales heterocigotos y mutantes EAR2 adultos. Para ello se realizó la prueba de la *Evitación pasiva* (Ugo Basile, modelo 7551). Esta prueba consistió en una cámara de metacrilato dividida en dos partes iguales. En la mitad izquierda dicho habitáculo tenía las paredes opacas y oscuras, con ausencia completa de luz. La mitad derecha estaba iluminada y las paredes eran de color blanco semiopacas. Ambas mitades estaban comunicadas por una puerta, la cual se cerraba una vez que el ratón pasaba del compartimento iluminado al oscuro (figura 3.11).

Antes de comenzar la sesión, el animal era colocado de manera individual en una zona oscura de la habitación. Pasados 5 minutos se introdujo en la cámara iluminada de la *Evitación pasiva*. Cuando el animal, molesto por la luz, se fue al compartimento oscuro, la puerta se cerró, quedando marcada la latencia de entrada en el aparato. Tras esto, se realizó una descarga de 0.5 mV durante 3 segundos en la cámara oscura, afectando al animal. Treinta segundos después, el animal se sacó de la cámara oscura y se devolvió a su jaula.

Este procedimiento se repitió a la hora (memoria a corto plazo, MCP) y a las 24 horas (memoria a largo plazo, MLP); sin embargo, en ninguna de estas dos sesiones se le volvió a repetir la descarga.

La latencia máxima de entrada al compartimento oscuro fue 178 segundos. Si el animal permanecía en el compartimento iluminado una vez pasado este tiempo, la puerta se cerraba automáticamente.



**Figura 3.11. Evitación pasiva.** Imágenes del aparato de la evitación pasiva en dos perspectivas distintas. Se observa los dos compartimentos diferenciados, el iluminado en color blanco y el que permaneció en la oscuridad, de color negro. En la fotografía de la izquierda se muestra, a la derecha, el pedal que marcaba el inicio de la prueba.

#### 3.2.4.2. Inhibición por prepulso (IPP)

La magnitud de las respuestas reflejas de sobresalto ante un estímulo sonoro fue medida en los ratones adultos silvestres, heterocigotos y mutantes EAR2. Para ello, se colocó a los animales individualmente en un habitáculo acondicionado para la medición de este tipo de respuestas (Cibertec, S.A., modelo REST 141). El habitáculo consiste en una cámara colocada dentro de un armario, que una vez que se cerraba la puerta aislaba al ratón del ruido exterior. Para permitir un flujo constante de aire, se conectó un ventilador dentro del habitáculo. Las respuestas de sobresalto se midieron usando un acelerómetro piezoeléctrico controlado por un ordenador. Una sesión típica de registro se desarrolló de la siguiente manera: (ver figura 3.12.D)

- Antes de comenzar la sesión, se colocó al animal durante tres minutos, en la habitación donde se realizó la prueba para producir una aclimatación al medio.

- Las respuestas de la línea basal se calcularon a partir de la presentación de 30 estímulos sonoros (125 dB durante 100 ms) aplicados cada 30 segundos.

- Durante los ensayos de *Inhibición por prepulso*, los mismos estímulos de 125 dB y 100 ms de duración, fueron precedidos en 250 ms por un pulso de 85 dB y 50 ms de duración. Estos pares de estímulos se presentaron aleatoriamente mezclados con estímulos de sobresalto normales, en una razón final de 25:25.

Esta prueba se realizó, de forma individual, en los ratones adultos de los tres grupos experimentales de la cepa C57BL/6 (silvestre, heterocigoto y mutante EAR2) y tuvo una duración aproximada de 45 minutos por animal.



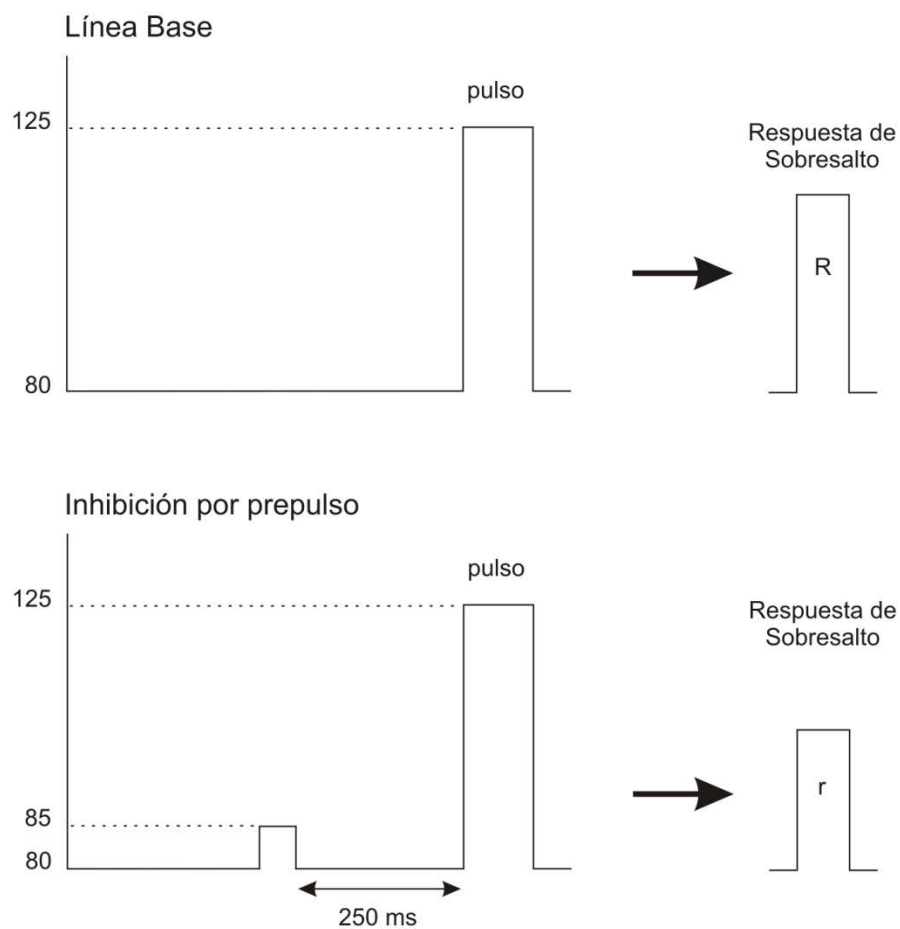
**Figura 3.12. Inhibición por prepulso.** (A) Representación general del aparato de la inhibición por prepulso. Nótese como la cámara estaba colocada dentro de un armario, aislándolo así del ruido exterior. (B) y (C) Imágenes de la cámara con más detalles. (D) Descripción de los pasos seguidos para la realización de la prueba. Cada sesión duró un total de 45 min., de los cuales los 3 primeros fueron de adaptación a la cámara. A continuación, se administraron 30 pulsos (125 dB, 100 ms) para calcular la línea base. 30 s después, el animal recibió 50 ensayos aleatorios, de los cuales 25 fueron pulsos aislados (225 dB, 100 ms) y otros 25 fueron pares de pulsos, esto es, con el pulso ya indicado (125 dB, 100 ms) precedido de otro de menor intensidad y duración (85 dB, 50 ms) para calcular la inhibición por prepulso. Todos los estímulos se separaron con un intervalo de 30 s. La sesión finalizó con 2 min. de reposo.

Los 30 primeros pulsos administrados al comienzo de la prueba establecen la *Línea Base* de cada animal y los parámetros que arroja el software nos dan una idea de

si la respuesta de sobresalto es distinta entre los grupos experimentales. Estos parámetros son: la latencia de respuesta (VMLR), la latencia al pico máximo (VMLP), el valor del pico máximo (VMP) y el área total de respuesta (VMA). Para evaluar la magnitud de la respuesta de sobresalto de cada uno de los grupos experimentales en el momento inicial, se midió el valor al pico máximo (VMP) y el valor de la latencia de respuesta (VMLR) en la línea base. A partir de los 50 pulsos siguientes demás, en esta prueba se grabaron y se cuantificaron cuatro índices distintos de inhibición por prepulso, relacionados con los mismos parámetros: latencia de respuesta (VMLR), la latencia al pico máximo (VMLP), el valor del pico máximo (VMP) y el área total de respuesta (VMA). Estos índices, destinados a cuantificar cuánto se modifica la respuesta de sobresalto cuando viene precedida del prepulso, se obtuvieron según la siguiente fórmula matemática (López-Ramos y cols., 2010): 
$$IPP = \frac{\text{Startle/Prepulso}}{\text{Línea base}} \times 100$$
, donde Startle es

la media de los valores obtenidos durante los 25 pulsos de 125 dB y 100 ms de duración, administrados aleatoriamente durante 25 minutos, para cada uno de los animales de los distintos grupos experimentales. Prepulso es el valor correspondiente a la media de los datos obtenidos durante los 25 pulsos del ensayo de inhibición por prepulso (25 estímulos con pulsos de 125 dB y 100 ms de duración, precedidas en 250 ms por un pulso de 85 dB y 50 ms de duración). Y Línea base, corresponde a los valores obtenidos durante los 30 primeros pulsos administrados al comienzo de la prueba.





**Figura 3.13. Análisis de la inhibición por prepulso.** Ilustración de la respuesta de sobresalto (R) producida por un pulso de 125 dB, 100 ms, y de la inhibición que se genera en esta respuesta tras administrar previamente otro pulso de menor tamaño (85 dB, 50 ms), originando una respuesta de menor tamaño (r).

#### 3.2.4.3. Condicionamiento operante: la jaula de Skinner

Se estudió si la disminución de neuronas en el núcleo Locus Coeruleus en los ratones adultos, tenían algún efecto sobre la adquisición de un condicionamiento instrumental de razón fija 1.

Los paradigmas de condicionamiento instrumental elegidos utilizaban la comida como elemento reforzador positivo. Antes de comenzar el condicionamiento y durante el mismo, se le restringió la comida a todos los animales ya que la privación de comida se usó como modulador del nivel de motivación de los animales para realizar determinadas respuestas que les permite obtener el refuerzo (Bruner, 2010). Para conseguir que todos los animales tuviesen la misma motivación, se estableció que se debía mantener a los animales entre el 85 – 75% de su peso habitual.

El primer día de privación de alimento se anotó el peso de cada uno de los animales y se les retiró toda la comida de la que disponían. Cada 24 horas, se volvía a pesar a los ratones y según la pérdida de peso que hubieran tenido en este periodo se les suministraba entre 2 y 4 g de comida. Este protocolo se mantuvo durante todo el periodo experimental de la realización de la prueba de condicionamiento operante.

El condicionamiento instrumental se realizó en jaulas de Skinner. La jaula consistió en una caja de acero inoxidable y plástico acrílico de medidas 12,5 × 13,5 × 18,5 cm (MED Associates Inc.; St. Albans, VT, EE.UU.) ubicada en el interior de una caja de insonorización (90 × 55 × 60 cm) la cual estaba constantemente iluminada (lámpara de 19 W) y expuesta a un ruido blanco de 45 dB (Cibertec, S.A.). Cada jaula de Skinner disponía de una palanca, un dispositivo de luz, que se encontraba 3 cm por encima de la palanca, y un comedero. La palanca estaba conectada a una entrada del panel de control (SmartCtrl™ Connection, SG - 716; MED Associates), el cual constaba de 3 entradas más y de 8 salidas. Una de las salidas del panel de control estaba conectada al dispensador de *pelets* y otra a la señal luminosa. El panel de control estaba conectado con la tarjeta de comunicación (SmartCtrl™ Interface Module, DIG-716; MED Associates). La función de la tarjeta era emitir señales a la jaula y recibir información de la misma y constaba de 4 entradas y 8 salidas. La tarjeta estaba instalada en el dispositivo Small Tabletop Cabinet and Power Supply 230V – 50 Hz, el cual suministraba los 28 V al panel de control *SmartCtrl™ Connection*, para poder alimentar los dispositivos de la jaula. En este dispositivo estaba instalada la tarjeta Decode Card, que, a su vez estaba conectada a otra tarjeta (PCI Card) instalada en el ordenador. De esta manera quedaba comunicada la tarjeta SmartCtrl™ Interface Module con el ordenador.

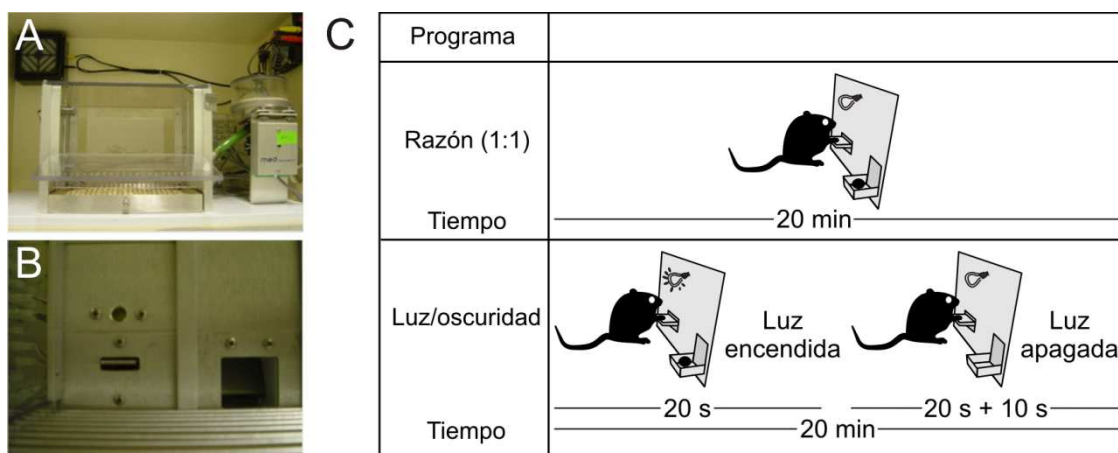
Gracias a este dispositivo, cada presión de la palanca era registrada por la tarjeta de comunicación a través del panel de control. A su vez, si la presión de la palanca era recompensada con un *pelet* (MLabRodent Tablet, 20 mg), el ordenador emitía una señal a través de la tarjeta de comunicación que era recogida por el panel de control y éste hacía que el rotor del dispensador de *pelets* girase y cayese una bolita de comida a través del tubo que lo comunicaba con el comedero.

Se sometió a los animales a dos programas de reforzamiento distintos: un programa de Razón fija 1 (RF1) y un programa con la luz como estímulo discriminativo (RAND luz- oscuridad).

Un programa de reforzamiento es un programa, o regla, que determina cómo y cuándo la ocurrencia de una respuesta irá seguida de un reforzador.

En un programa de razón, el número de refuerzos depende del número de respuestas que realice el sujeto. En el caso de razón fija 1, que es el caso de este experimento, el sujeto sólo deberá emitir la respuesta una vez para ser reforzado. Este tipo de reforzamiento se denomina reforzamiento continuo (RFC). En el presente trabajo, la respuesta que debía ejercer el animal era presionar la palanca y como refuerzo obtenía una bola de comida o *pelet*. Cada una de las sesiones de condicionamiento de reforzamiento continuo duraba 20 minutos.

Una vez aprendida la asociación presión de palanca- comida, se quiso saber si el animal podría aprender una tarea más compleja. Así, se diseñó un programa de refuerzo con un estímulo discriminativo. Como estímulo discriminativo se utilizó un dispositivo luminoso situado 3 cm por encima de la palanca. La emisión de luz por parte de este dispositivo señalaba el tiempo durante el cual la emisión de la respuesta (presión de la palanca) sería reforzada con una bola de comida. Las sesiones de condicionamiento bajo este programa fueron de 20 minutos. Durante 20 segundos la luz permanecía encendida y cada vez que el animal presionaba la palanca era reforzado con un *pelet*. Pasados los 20 segundos se apagaba la luz y durante este tiempo (20 s.) el animal no recibía ningún refuerzo por presionar la palanca. A estos 20 segundos de oscuridad eran añadidos de 1 a 10 segundos más de ausencia de luz, si durante este tiempo el animal presionaba la palanca. El tiempo adicional de oscuridad volvía a ser contado desde el principio. Cuando terminaba el periodo de oscuridad se encendía de nuevo la luz durante 20 segundos y así sucesivamente hasta completar los 20 minutos de sesión.



**Figura 3.14. Condicionamiento operante.** (A) Muestra general de la jaula de Skinner. (B) Vista con detalle de la palanca, situada a la izquierda de la jaula y el comedero, a la derecha. Encima de la palanca se situaba la luz, la cual estuvo apagada en el primer programa de razón fija. (C) Esquema resumen de los dos programas utilizados en la jaula de Skinner. En la parte superior se muestra una ilustración del programa de razón fija 1 (RF1). En estas sesiones, cada vez que el animal presionaba la palanca recibía una bolita de comida. Abajo se muestra el programa de luz/ oscuridad. Durante 20 segundos la luz permanecía encendida y cada vez que el animal presionaba la palanca era reforzado con un *pelet*. Pasados los 20 segundos se apagaba la luz y durante este tiempo el animal no recibía ningún refuerzo por presionar la palanca. A estos 20 segundos de oscuridad eran añadidos de 1 a 10 segundos más de ausencia de luz, si durante este tiempo el animal presionaba la palanca. El tiempo adicional de oscuridad volvía a ser contado desde el principio. Cuando terminaba el periodo de oscuridad se encendía de nuevo la luz durante 20 segundos y así sucesivamente hasta completar los 20 minutos de sesión. Imagen obtenida del artículo de Jurado-Parras y cols., 2013.

Para determinar si los animales habían adquirido la tarea de asociación palanca-comida, y a qué velocidad lo habían hecho, se fijó un criterio de aprendizaje. Se consideró que cuando los animales presionaban la palanca 20 veces o más, durante dos sesiones consecutivas de condicionamiento de razón fija 1, ya habían adquirido la tarea. Así, se anotó el número de días que necesitaron los animales de los distintos grupos experimentales en aprender la asociación palanca- comida.

Para evaluar el aprendizaje de los animales durante la adquisición del condicionamiento instrumental con un estímulo discriminativo se estableció un índice al que se denominó índice luz/oscuridad (I<sub>l/o</sub>) (Jurado-Parras y cols., 2013). El índice se

calculó según la siguiente expresión matemática:  $I_{l/o} = \frac{N_{\text{palanca luz}} - N_{\text{palanca no luz}}}{N_{\text{palanca total}}}$ , donde

el N palanca luz es el número de veces que el animal presiona la palanca durante el periodo de luz, N palanca sin luz es el número de veces que el animal presiona la palanca durante el periodo de oscuridad y N palanca total es el número total de veces que el animal presiona la palanca durante la sesión de condicionamiento, que será el

resultado de la suma del número de presiones de palanca durante el periodo de luz y el número de presiones de palanca durante el periodo de oscuridad. De tal manera que el  $II/o$  puede tomar valores que oscilan entre -1 y 1. A medida que los animales van adquiriendo la tarea el  $II/o$  va aumentando su valor. Se hizo un seguimiento de este índice durante 7 sesiones consecutivas.

Si  $N$  palanca sin luz  $>$   $N$  palanca luz entonces  $-1 \leq II/o < 0$

Si  $N$  palanca sin luz  $<$   $N$  palanca luz entonces  $0 < II/o \leq 1$

#### **3.2.4.4. Reconocimiento de objetos**

La última prueba de memoria fue el *Reconocimiento de objetos*.

La prueba se realizó en una jaula de metacrilato (40 x 25 x 20 cm.), en las que se colocó al animal de forma individual. La caja estaba separada de otras por barreras de cartón, para impedir así cualquier contacto visual entre jaulas. Todas las sesiones fueron grabadas desde arriba por una cámara de vídeo (Sony, modelo DCR-SR36E).

Se introdujo a los animales en la cámara de experimentación de metacrilato durante 5 minutos. Fue un periodo inicial de habituación a la jaula. En este tiempo se evaluó su capacidad exploratoria y la actividad en general. Transcurrido el periodo de aclimatación, se colocaron dos objetos #1 y #2, los cuales eran del mismo tamaño, material y forma. Fue la sesión de entrenamiento que duró 5 minutos, al igual que la sesión anterior.

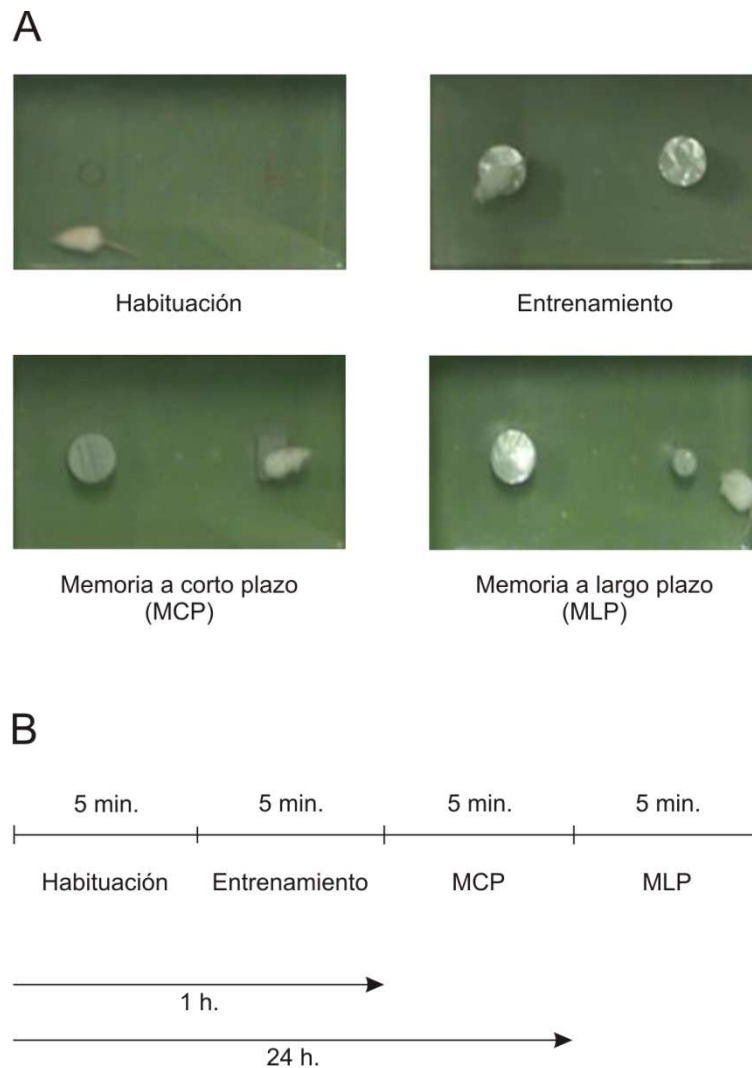
Pasada una hora, se evaluó la memoria a corto plazo (MCP). Para ello, se volvió a colocar al animal en la jaula de metacrilato durante 5 minutos. En esta sesión, se colocó uno de los objetos utilizados en la sesión de entrenamiento #1, que fue el objeto conocido, y un nuevo objeto, #3. El objeto novedoso era del mismo material que el primer objeto, pero varió en la forma.

Transcurridas 24 horas, con el fin de medir la memoria a largo plazo (MLP), se volvió a repetir la prueba. En esta sesión el objeto conocido (#1) se mantuvo de nuevo, y se volvió a cambiar el novedoso por otro distinto a las anteriores sesiones (#4) (ver figura 3.15.).

Tras la realización de cada una de las sesiones de la prueba, la jaula y los objetos fueron lavados con etanol al 70% para evitar reconocimiento de olores.

Todos los objetos utilizados en la prueba de Reconocimiento de objetos se habían validado en pruebas anteriores, comprobando que los animales no tenían preferencia por ninguno de ellos.

Los animales adultos pasaron por todas las sesiones que constituyeron la prueba de Reconocimiento de objetos (habitación, entrenamiento, memoria a corto plazo y memoria a largo plazo). Los animales neonatos de ambas cepas, realizaron esta prueba una vez que abrieron los ojos. Sin embargo, no fueron sometidos a la última sesión de memoria a corto plazo. En ambos casos, los ratones realizaron la prueba del Reconocimiento de objetos por primera vez.



**Figura 3.15. Reconocimiento de objetos.** (A) Representación de las 4 sesiones de la prueba de *Reconocimiento de objetos*. Nótese como uno de los objetos presentado en la fase de entrenamiento, se identificó como conocido, siendo éste siempre el que permaneció en las distintas sesiones que se dieron a continuación. (B) Esquema temporal de la sucesión de las distintas fases experimentales. La primera sesión fue la de habituación, en la que se puso el animal en la jaula en ausencia de objetos. A continuación se colocó dos objetos iguales, fue la fase de entrenamiento. Pasada una hora se analizó la memoria a corto plazo. En esta sesión, se dejó el objeto conocido y se cambió uno de ellos por un objeto nuevo. Al día siguiente, a las 24 horas, se evaluó la memoria a largo plazo. Para ello, se volvió a cambiar el objeto novedoso por otro nuevo completamente, dejando en la caja también el objeto conocido. Todas las sesiones experimentales tuvieron una duración de 5 min.

Para el análisis de los datos de la prueba de *Reconocimiento de objetos*, se estableció un índice al que se denominó índice de exploración ( $I_E$ ) (Dornelles y cols., 2007). El coeficiente se calculó según la siguiente expresión matemática:  $I_E = \frac{C_2}{C_1 + C_2}$ , donde  $C_2$  es el número de contactos que el animal realizó con el objeto novedoso y  $C_1$  los

contactos realizados con el objeto conocido.  $C_1 + C_2$  es el número total de contactos realizados por el ratón en la sesión estudiada.

Si  $C_2 > C_1$  entonces,  $0,5 < I_E < 1$ , lo que significa que el ratón exploró un mayor número de veces el objeto novedoso que el objeto conocido. Este resultado se dio como positivo en las sesiones de memoria a corto y a largo plazo.

Si  $C_2 = C_1$  entonces,  $I_E = 0,5$ , por lo que el animal exploró los dos objetos un mismo número de veces. Este resultado se debe obtener en la fase de entrenamiento y en las pruebas de validación de los objetos, demostrando que no existió preferencia por ninguno de ellos.

Si  $C_2 < C_1$  entonces,  $0,5 > I_E > 0$ , que indica que el ratón exploró durante más tiempo el objeto conocido frente al novedoso, demostrando así neofobia.

### 3.2.5. Prueba de la placa caliente

Finalmente, se estudió la analgesia de cada uno de los grupos experimentales, tanto neonatos como adultos. Con objeto de evaluar la percepción del dolor por el ratón, se utilizó una placa caliente (Accublock, Digital dry bath; Labnet), la cual tenía paredes de metacrilato (10,5 x 16,5 x 14 cm) que impedían al animal escapar de la zona de calor.

El animal se introdujo, de forma individual, en la placa una vez que ésta alcanzó la temperatura de 52,2°C, según se describe en Mas-Nieto y cols. (2005). El tiempo máximo de permanencia en la placa fue de 240 segundos. Una vez superado este tiempo, el animal fue retirado a su jaula.

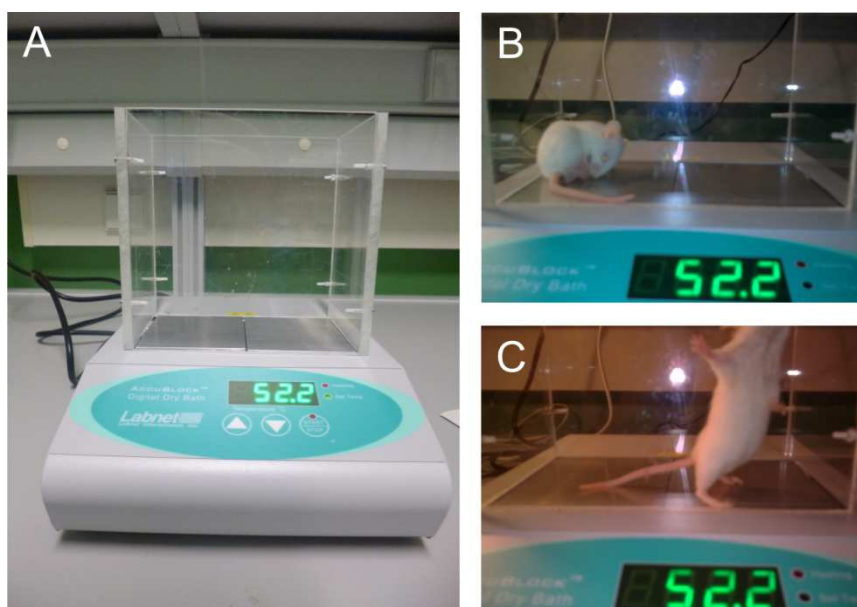
Al igual que el *Actímetro* y el *Reconocimiento de objetos*, la prueba de la *Placa caliente* se realizó en los animales neonatos una vez que abrieron los ojos (P16-P18). Y también se hizo para los ratones adultos de la cepa C57BL/6 para los tres grupos experimentales (silvestres, heterocigotos y mutantes EAR2). En ambos casos, los ratones realizaron esta prueba por primera vez.

Se analizaron dos parámetros, la sensibilidad (T1) y la respuesta comportamental al dolor.



La sensibilidad o umbral doloroso (T1) corresponde con el tiempo, medido en segundos, que emplearon los animales en lamerse las patas por primera vez (figura 3.16.B). El tiempo máximo en mostrar esta respuesta fue de 15 segundos, anotando este valor a aquellos animales que tardaron un tiempo mayor o no mostraron la respuesta

La respuesta comportamental al dolor (T2), representó la latencia, medida en segundos, que el animal empleó en intentar escapar de la placa caliente alzándose tres veces sobre las paredes de metacrilato, apoyando las dos patas delanteras, o dando un salto. El tiempo máximo de la prueba fue de 240 segundos, anotando, como en el caso anterior, este valor a aquellos animales que tardaron más en escapar o no lo intentaron. (ver figura 3.16.C).



**Figura 3.16. Variables de la placa caliente.** (A) Fotografía de la placa caliente utilizada en el experimento. Se puede observar las paredes de metacrilato que impedían que el animal saliese de la zona caliente. Los bloques se calentaron hasta alcanzar una temperatura de 52,2 °C. (B) Representación de un animal lamiéndose las patas por primera vez (umbral doloroso, T1). (C) Imagen de un ratón alzándose y apoyando sus patas delanteras sobre la pared de metacrilato. Al repetir este comportamiento tres veces, se consideró una conducta de escape (T2), retirándolo de la placa y completando así la prueba. Nótese como la placa caliente permaneció a una temperatura constante de 52,2 °C.

### **3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los datos se representaron a partir de su valor promedio  $\pm$  el error estándar del promedio. Los análisis estadísticos se hicieron utilizando el programa IBM SPSS Statistics 18.0 (IBM, Armonk, New York, EE.UU.). El nivel estadístico de significancia fue  $p = 0,05$ . Las diferencias estadísticas de los valores de las medias se determinaron a través del análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías (con las sesiones como medidas repetidas), según el caso. Además, se realizó un análisis de contraste (Bonferroni – test) cuando el análisis anterior mostró diferencias estadísticamente significativas para estudiar la naturaleza de las mismas.

## ***4. RESULTADOS***



#### 4.1. ESTUDIO DE LA INTERVENCIÓN DEL SISTEMA ADRENÉRGICO EN LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA POSTNATAL

Al objeto de determinar cómo influye el sistema noradrenérgico en el control de la actividad respiratoria durante el desarrollo postnatal temprano, se registró durante dos minutos, mediante el empleo de la técnica de plestimografía de cuerpo completo, la respiración de los individuos de cada uno de los grupos experimentales.

El primero de los parámetros estudiados fue la amplitud o volumen tidal de cada onda respiratoria. Como se puede observar en la figura 4.1.A, los animales control de la cepa CD1 fueron aumentando su volumen tidal a medida que pasaban los días experimentales, alcanzando valores de  $13,98 \pm 3,82 \mu\text{l/g}$  para el sexto día postnatal. Sin embargo, tanto los sujetos tratados con ácido retinoico como los animales tratados postnatalmente con clonidina, aunque presentaron unos valores mayores que el grupo control el primer día de la prueba ( $p < 0,001$ ), a medida que fueron pasando los días experimentales fueron disminuyendo sus valores de  $V_t$ . No obstante el grupo tratado con ácido retinoico presentó unos valores similares al grupo control, siendo el grupo tratado con clonidina el que mostró unos valores mayores de  $V_t$  ( $p < 0,001$ ). El sexto día postnatal, los valores de los tres grupos fueron más similares, sin embargo, el grupo clonidina seguía presentando los valores mayores de  $V_t$ .

Al estudiar los animales de la cepa C57BL/6 (figura 4.1.B), se observó que los grupos experimentales silvestre y los mutantes heterocigotos EAR2 mostraron una progresión positiva de los valores de amplitud de onda respiratoria a medida que sucedieron los días de registro. Sin embargo, los mutantes homocigotos EAR2 no presentaron un aumento del volumen tidal, encontrando diferencias estadísticamente significativas con el grupo silvestre para el cuarto y sexto día postnatal ( $p = 0,029$  y  $p = 0,009$  respectivamente). En el lado opuesto, se encontraron los sujetos heterocigotos EAR2, que presentaron unos valores de  $V_t$  mayores que los animales silvestres durante todos los días de registro. los días postnatales ( $p \leq 0,001$ ).

A continuación, se quiso analizar la frecuencia respiratoria de los distintos grupos experimentales, dado que se ha visto que distintas mutaciones que afectan a la integridad del LC (A6) y del núcleo subcerúleo (A5) acaban afectando a la frecuencia respiratoria postnatal. Por norma, la frecuencia respiratoria aumenta conforme van pasando los días.

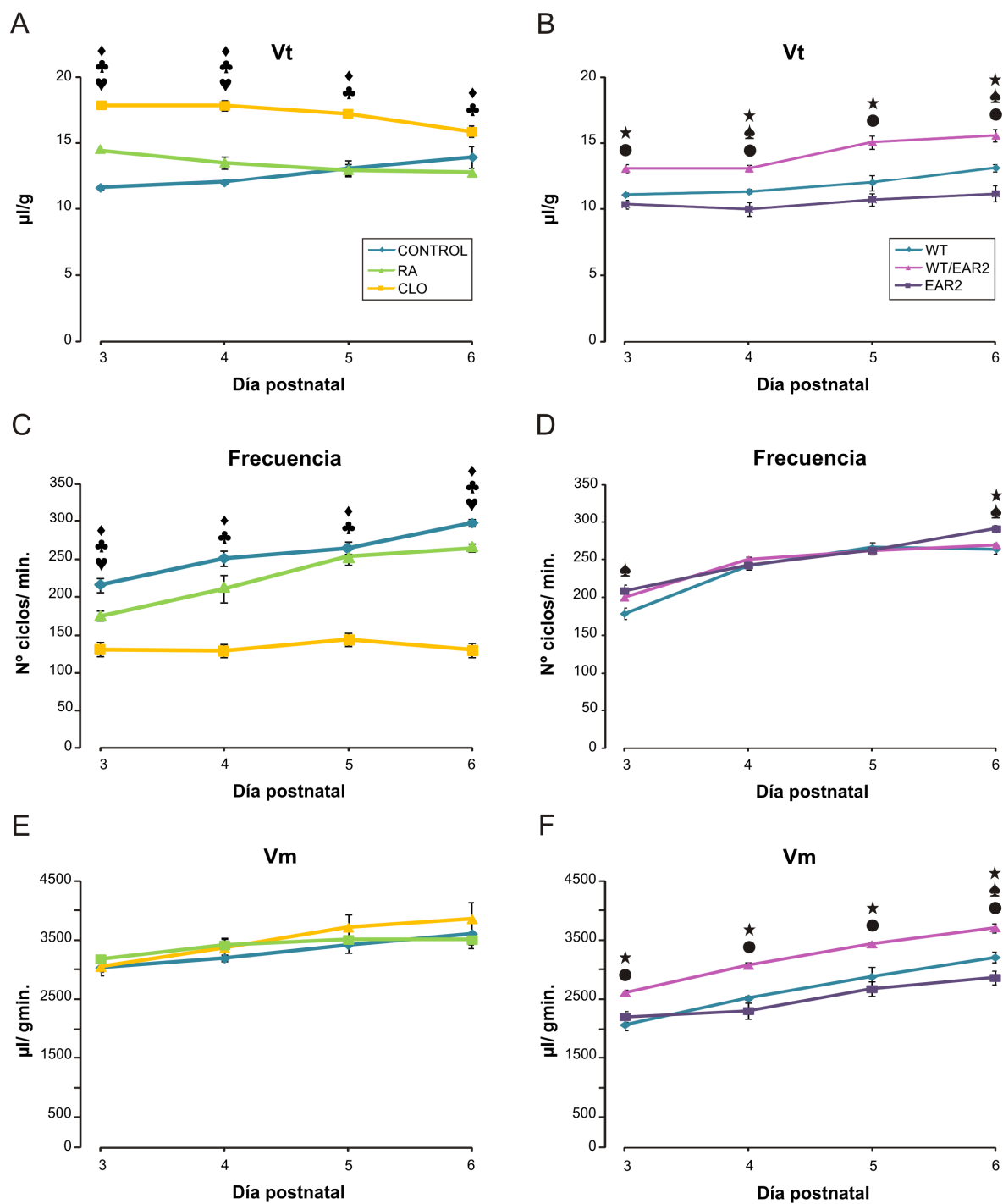
Así, en la figura 4.1.C, se puede observar como tanto el grupo control como el tratado con ácido retinoico fueron aumentando significativamente el número de ciclos por minutos a medida que iban avanzando los días experimentales. Sin embargo, los animales tratados con clonidina presentaron una frecuencia constante a lo largo de los días de registro, obteniéndose valores menores que los presentados por los otros dos grupos experimentales ( $p < 0,001$ ). Nótese que, tanto el primero como el último día de realización del experimento, se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos experimentales. Los sujetos control obtuvieron los valores más altos de frecuencia ( $297,93 \pm 5,04$  nº ciclos/ minuto, para el sexto día postnatal) frente a los animales tratados con clonidina, cuyos valores fueron los menores ( $130,11 \pm 9,42$  nº ciclos/ minuto, para el último día del registro respiratorio, P6). Y finalmente, se encontró al grupo tratado con retinoico con valores intermedios entre ambos ( $264,47 \pm 5,52$  nº ciclos por minuto para P6); ( $p < 0,003$  para el grupo control frente a los animales retinoicos y  $p < 0,001$  para los animales tratados con ácido retinoico frente a los sujetos clonidina).

Los animales de la cepa C57BL/6 (Figura 4.1.D) ), en los tres grupos experimentales, silvestres y mutantes heterocigotos y homocigotos EAR2, fueron aumentando el número de ciclos por minuto a lo largo de la prueba. Sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas el primer y el último día experimental. En el primer día, los animales mutantes homocigotos mostraron una frecuencia mayor que los sujetos silvestres ( $p = 0,006$ ). Para el último día, los sujetos homocigotos EAR2 mostraron un mayor número de ciclos por minuto que los animales silvestres y que los animales heterocigotos ( $263,98 \pm 6,77$  para el grupo silvestre y  $269,48 \pm 2,46$  para los animales heterocigotos frente a  $290,60 \pm 4,40$  de los sujetos homocigotos EAR2;  $p = 0,001$  para silvestres - homocigotos y  $p = 0,009$  para heterocigotos - homocigotos).

Como complemento de las dos variables anteriores analizadas, se calculó el volumen respirado por minuto de cada uno de los grupos experimentales. Los animales de los grupos de la cepa CD1, los sujetos tratados con ácido retinoico, el grupo tratado con clonidina y su grupo control, aumentaron su volumen respirado por minuto a medida que iban pasando los días de la prueba. Asimismo, se puede observar en la figura 4.1.E, como no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos experimentales. Sin embargo, el grupo tratado postnatalmente con clonidina mostró una tendencia a presentar unos valores mayores que los animales control ( $3193,54 \pm 58,81$

V<sub>m</sub> del grupo control frente a  $3417,73 \pm 106,86$  para los sujetos tratados postnatalmente con clonidina en el cuarto día postnatal).

Los tres grupos experimentales de la cepa C57BL/6, los mutantes heterocigotos y homocigotos EAR2 y el grupo silvestre, fueron incrementando sus valores de volumen respirado por minuto a medida que pasaron los días experimentales. Sin embargo, los animales heterocigotos EAR2 presentaron unos valores mayores de V<sub>m</sub> que los animales silvestres durante todos los días experimentales ( $0,001 < p \leq 0,005$ ). El último día de registro, el sexto día postnatal, los animales heterocigotos EAR2 prosiguieron con estos valores mayores de V<sub>m</sub> que los animales control, mientras que los mutantes homocigotos EAR2 presentaron unos valores inferiores que los controles, encontrándose en ambos casos diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,001$  y  $p = 0,039$  respectivamente).



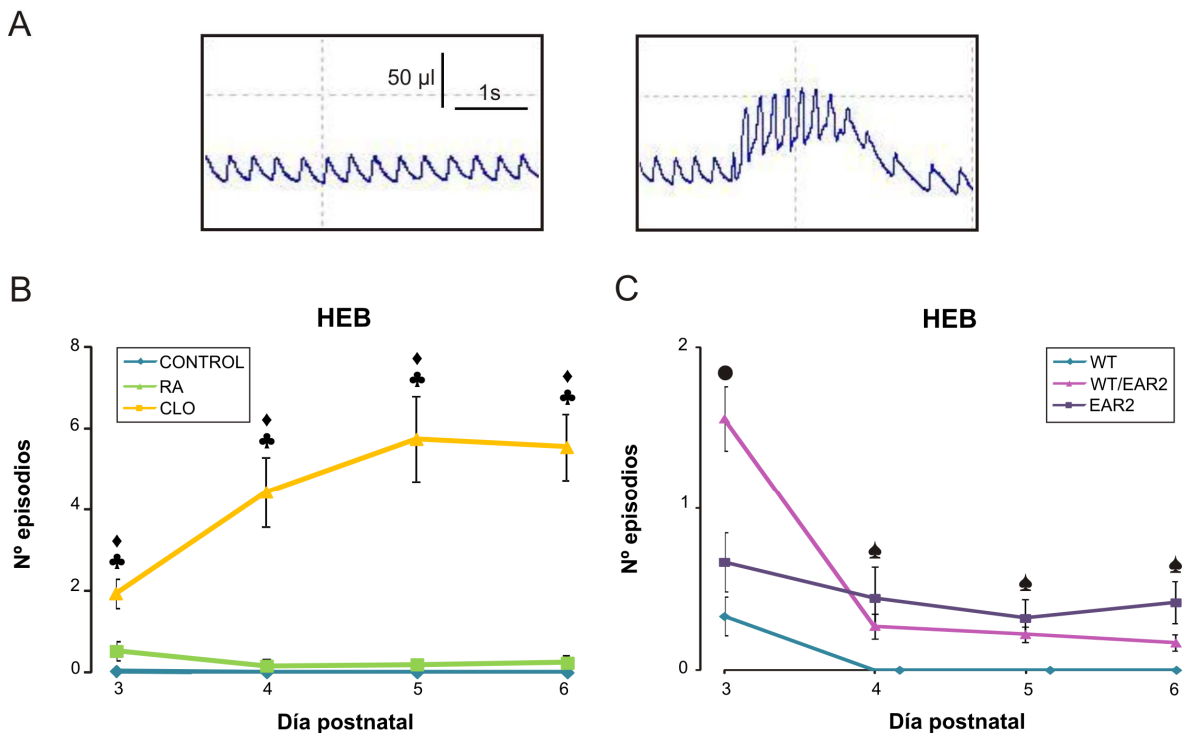


**Figura 4.1. Análisis de la actividad respiratoria en una cámara de plestimografía de cuerpo completo en el periodo comprendido entre el tercer y el sexto día postnatal. (A) (B)** Evolución temporal de la amplitud de onda (Vt) registrada para cada uno de los grupos experimentales. (A) Cepa CD1; ratones tratados con ácido retinoico (RA), sujetos tratados postnatalmente con clonidina (CLO) y sus sujetos controles. Nótese como los animales control aumentaron su Vt a medida que sucedían los días experimentales, mientras que los tratados con ácido retinoico y con clonidina disminuyeron sus valores a medida que avanzaban los días de registro. El grupo tratado con clonidina mostraron unos valores de Vt más altos que los animales control, representado con el símbolo ♣ y que los animales tratados con ácido retinoico, simbolizado con un ♦. Sólo existieron diferencias entre los ratones tratados con ácido retinoico y los control en los dos primeros días de registro, representado por el símbolo ♥, siendo los valores de Vt de los animales tratados con AR mayores que los de sus controles (B) Cepa C57BL/6, grupo silvestre (WT) y ratones heterocigotos (WT/EAR2) y homocigotos (EAR2). Todos los grupos experimentales mostraron una progresión en los valores de Vt a medida que pasaban los días de registro. Sin embargo, el grupo heterocigoto presentó unos valores mayores que los sujetos silvestres, representado por el símbolo ●, y que los mutantes homocigotos, representado por ★. Nótese que sólo existieron diferencias entre los ratones silvestres y los homocigotos EAR2 en el segundo y último día de registro, representado por el símbolo ♠. (C) (D) Representación del número de ciclos por minuto (frecuencia) realizado por los sujetos experimentales de la cepa CD1 (C) y de la cepa C57BL/6 (D). Nótese como los animales tratados con ácido retinoico y los controles de la cepa CD1, aumentaron los valores de frecuencia a medida que sucedieron los días de registro, mientras que los tratados con clonidina se mantuvieron constantes durante toda la prueba, con valores significativamente menores que los obtenidos por el grupo control (♣) y por el tratado con ácido retinoico (♦). Nótese como no existen a penas diferencias en los valores de frecuencia entre los grupos silvestres, mutantes heterocigotos y homocigotos EAR2. (E) (F) Volumen de aire respirado por minuto (Vm) para los animales pertenecientes a la cepa CD1 (E) y a los sujetos de la cepa C57BL/6 (F). Nótese como no existen diferencias entre los animales tratados con ácido retinoico, los tratados postnatalmente con clonidina y sus controles en el volumen total de aire respirado por minuto. Sin embargo, al estudiar los animales de la cepa C57BL/6 se observa que los animales mutantes heterocigotos EAR2 presentaron unos valores de Vm mayores que los animales silvestres (representado por ●) y que los mutantes homocigotos (★).

En estudios realizados anteriormente se detectaron episodios de hiperpnea en los ratones tratados con ácido retinoico (figura 4.2.A, ver Materiales y métodos) en el periodo comprendido entre el tercer y el sexto día postnatal. Se quiso analizar también la aparición de estos episodios para todos los grupos experimentales. Así se puede observar en la figura 4.2.B, correspondiente a la cepa CD1, como los animales tratados con clonidina presentaron una mayor actividad de episodios de hiperpnea que los animales control y los tratados con ácido retinoico para todos los días registrados ( $0,00 \pm 0,00$  episodios para el grupo control,  $0,16 \pm 0,08$  HEBs para los animales tratados con ácido retinoico y  $5,74 \pm 0,88$  ciclos de hiperpnea para los sujetos tratados con clonidina, para el quinto día postnatal;  $p < 0,001$ ).

En los sujetos de la cepa C57BL/6 (Figura 4.2.C), fueron los animales mutantes homocigotos EAR2 los que tuvieron un mayor número de episodios que los silvestres, encontrándose los ratones heterocigotos con valores intermedios. ( $0,00 \pm 0,00$  HEBs para el grupo control,  $0,27 \pm 0,08$  episodios para los animales heterocigotos y  $0,44 \pm 0,19$

ciclos de hiperpnea para los sujetos homocigotos, para el cuarto día postnatal). Sin embargo, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los animales control y los mutantes homocigotos EAR2 en el periodo comprendido entre el cuarto y sexto día postnatal ( $p = 0,034$ , en el cuarto día;  $p = 0,007$ , para P5 y  $p = 0,001$  para el sexto día postnatal). También se puede observar, como el primer día de realización de la prueba, P3, los animales heterocigotos EAR2 mostraron un valor significativamente mayor de episodios en comparación con los ratones control ( $p < 0,001$ ), sin embargo, a partir del cuarto día postnatal la diferencia entre el número de episodios entre ambos grupos no fue significativa.



**Figura 4.2. Aparición de episodios de hiperpnea (HEB) durante el tiempo de registro mediante la técnica de plestimografía de cuerpo completo. (A)** Ilustración de una respiración cíclica normal, a la izquierda, frente a una respiración con episodios de hiperpnea, mostrada a la derecha. **(B) (C)** Evolución temporal del número de episodios realizados por cada grupo experimental de la cepa CD1 (B) y la cepa C57BL/6 (C), durante los dos minutos correspondientes a la prueba de actividad respiratoria. Nótese como los animales tratados con clonidina (CLO) presentaron un número de HEB mayores que los sujetos control, representado por el símbolo ♣. Mientras que los animales tratados con ácido retinoico (RA) sólo mostraron una leve tendencia a presentar este tipo de episodios, sin ser diferente estadísticamente con los animales control, pero sí con los tratados con clonidina, representado por el símbolo ♦. Al estudiar los animales mutantes EAR2 se observó que tanto los ratones heterocigotos (WT/EAR2) como los homocigotos (EAR2) presentaron un mayor número de aparición de episodios de hiperpnea que los ratones silvestres (WT). Sin embargo, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los animales homocigotos EAR2 y los ratones silvestres, representado por el símbolo ♠.

## 4.2. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA ADRENÉRGICO EN EL DESARROLLO POSTNATAL: BATERÍA DE FOX

Con el fin de evaluar en los ratones el efecto postnatal de distintas alteraciones en la función del sistema noradrenérgico, se realizó una serie de pruebas englobadas en lo que se conoce como Batería de Fox (ver Materiales y métodos).

### 4.2.1. Primer día de realización de las pruebas y aparición de marcadores de desarrollo

Con objeto de obtener una visión general y ver las posibles diferencias entre los grupos experimentales para las pruebas de la batería de Fox, se elaboró una tabla que muestra el día en que los sujetos experimentales realizaron cada prueba por primera vez (Tabla 4.1).

Así, como se puede observar en la tabla 4.1.A, correspondiente a los ratones de la cepa CD1 (grupo tratado con ácido retinoico, ratones tratados postnatalmente con clonidina y los sujetos control), los animales tratados con clonidina mostraron un retraso generalizado en la realización de la mayoría de las pruebas con respecto al grupo control, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ). Sólo para las pruebas de *Suspensión* ( $7,23 \pm 0,07$  días, para el grupo control, frente a  $7,03 \pm 0,17$  días empleados por el grupo clonidina), *Geotaxia negativa* ( $3,63 \pm 0,28$  días utilizados por el grupo control contra  $4,07 \pm 0,21$  días del grupo tratado con clonidina) y *Estimulación de las vibrisas* (valor del grupo control,  $3,23 \pm 0,15$  días frente al valor del grupo clonidina,  $3,88 \pm 0,26$  días), obtuvo los mismos valores que el grupo control, no existiendo diferencias entre los dos grupos.

El grupo tratado con ácido retinoico realizó la mayoría de las pruebas el mismo día que el grupo control, exceptuando la prueba de *Vértigo*, en la que los sujetos tratados tardaron menos en realizarla ( $1,85 \pm 0,13$  días del grupo control frente a  $1,29 \pm 0,08$  días empleados por el grupo retinoico;  $p < 0,001$ ). Sin embargo, en la prueba de *Sobresalto*, los animales retinoicos ejecutaron la prueba con un mayor retraso que el grupo control ( $8,20 \pm 0,07$  días para el grupo control frente a  $10,23 \pm 0,42$  días del grupo tratado con ácido retinoico;  $p < 0,001$ ), al igual que ocurrió en el marcador de desarrollo de *Apertura de ojos*, en el que los animales tratados con ácido retinoico abrieron los ojos más tarde

que los controles ( $14,21 \pm 0,08$  días empleados en mostrar el reflejo para el grupo control frente a  $15,25 \pm 0,11$  días del grupo tratado con ácido retinoico;  $p < 0,001$ ).

Entre los grupos tratados con ácido retinoico y con clonidina también existieron diferencias en la realización de las pruebas por primera vez. Así, al igual que ocurrió con el grupo control, para las pruebas *Reflejo de giro*, *Vértigo*, *Separación de las orejas* y *Estimulación de las orejas*, el grupo tratado con clonidina mostró un retraso en la realización de las pruebas por primera vez con respecto al grupo tratado con ácido retinoico, mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ). Además de estas pruebas, para la *Estimulación de las vibrisas*, el grupo tratado con ácido retinoico mostró este reflejo con anterioridad a los animales tratados con clonidina ( $3,00 \pm 0,33$  días para el grupo tratado con ácido retinoico frente a  $3,88 \pm 0,10$  días empleados por el grupo tratado con clonidina;  $p < 0,001$ ).

En los ratones de la cepa C57BL/6 (grupos mutantes heterocigoto y homocigoto EAR2 y ratones silvestres), también se encontraron diferencias entre los grupos, pero menos acusadas que las encontradas para la cepa CD1. Así, como se puede ver en la tabla 4.1.B, el grupo mutante homocigoto EAR2 mostró, con respecto al grupo silvestre, un retraso en la realización de las pruebas de *Geotaxia negativa* ( $3,25 \pm 0,27$  días para el grupo silvestre frente a  $4,30 \pm 0,21$  días empleados por el grupo homocigoto EAR2;  $p < 0,05$ ) y en la *Estimulación de las orejas* ( $6,89 \pm 0,34$  días del grupo silvestre frente a  $9,35 \pm 0,55$  días transcurridos para el grupo homocigoto EAR2;  $p < 0,001$ ). Sin embargo, para la prueba de *Sobresalto*, el grupo homocigoto EAR2 realizó la prueba con anterioridad a los animales silvestres ( $8,10 \pm 0,07$  días para el grupo silvestre frente a  $7,40 \pm 0,11$  días del grupo homocigoto;  $p < 0,001$ ).

El grupo heterocigoto EAR2, sólo mostró diferencias con el grupo silvestre para el marcador de *Separación de las orejas*, realizando esta separación antes que el grupo silvestre ( $3,83 \pm 0,14$  días necesarios para mostrar este marcador para el grupo silvestre frente a  $3,55 \pm 0,23$  días del grupo heterocigoto;  $p < 0,05$ ). Para el resto de las pruebas no existieron diferencias entre estos dos grupos.

Sin embargo, al comparar el grupo heterocigoto con el mutante homocigoto EAR2, se encontró un mayor número de diferencias que el obtenido con el grupo silvestre. Así, como puede observarse en la tabla 4.1.B, para la prueba de *Estimulación de las orejas*, los sujetos heterocigotos mostraron este reflejo con anterioridad a los animales

homocigotos mutantes ( $7,70 \pm 0,47$  días empleados por el grupo heterocigoto frente a  $9,35 \pm 0,55$  días del grupo homocigoto EAR2;  $p < 0,05$ ), resultado que, como se ha mencionado anteriormente, también se obtuvo al compararlo con los sujetos silvestres, por lo que el grupo homocigoto se mostró el más lento en la realización del reflejo del movimiento de la oreja. Además de la prueba de *Estimulación de las orejas*, los animales heterocigotos también realizaron antes las pruebas de *Suspensión* ( $7,00 \pm 0,00$  días para el grupo heterocigoto frente a  $7,50 \pm 0,17$  días del grupo EAR2) y *Separación de las orejas* ( $3,55 \pm 0,23$  días para el grupo heterocigoto frente a  $4,25 \pm 0,10$  días empleados por el grupo homocigoto;  $p < 0,05$ ), encontrando diferencias estadísticamente significativas en ambos casos ( $p < 0,05$ ).

A

Prueba	CONTROL	RA	CLO
Reflejo de giro	1,19 ± 0,11	1,03 ± 0,03	2,11 ± 0,11 ♣♦
Vértigo	1,85 ± 0,13	1,29 ± 0,08 ♥	2,74 ± 0,11 ♣♦
Geotaxia negativa	3,63 ± 0,28	3,36 ± 0,22	4,07 ± 0,21
Suspensión	7,23 ± 0,07	7,08 ± 0,04	7,03 ± 0,17
Estimulación de los bigotes	3,23 ± 0,15	3,00 ± 0,33	3,88 ± 0,26 ♦
Separación de orejas	4,13 ± 0,09	3,88 ± 0,42 ♥	4,71 ± 0,10 ♣♦
Reflejo de sobresalto	8,20 ± 0,07	10,23 ± 0,10 ♥	10,00 ± 0,40 ♣
Estímulo de orejas	5,11 ± 0,18	5,18 ± 0,16	10,28 ± 0,12 ♣♦
Apertura de ojos	14,21 ± 0,08	15,00 ± 0,06 ♥	15,25 ± 0,11 ♣

B

Prueba	WT	WT/EAR2	EAR2
Reflejo de giro	1,50 ± 0,15	1,75 ± 0,14	2,05 ± 0,29
Vértigo	1,95 ± 0,20	1,75 ± 0,16	2,35 ± 0,27
Geotaxia negativa	3,25 ± 0,27	3,53 ± 0,41	4,30 ± 0,21 ♠
Suspensión	7,35 ± 0,13	7,00 ± 0,00	7,50 ± 0,17 ★
Estimulación de los bigotes	3,40 ± 0,11	4,20 ± 0,34	4,20 ± 0,21
Separación de orejas	3,83 ± 0,14	3,55 ± 0,23 ●	4,25 ± 0,10 ★
Reflejo de sobresalto	8,10 ± 0,07	7,75 ± 0,16	7,40 ± 0,11
Estímulo de orejas	6,89 ± 0,34	7,70 ± 0,47	9,35 ± 0,55 ♠★
Apertura de ojos	13,55 ± 0,15	13,85 ± 0,18	13,75 ± 0,16

C

♥	CONTROL - RA
♣	CONTROL - CLO
♦	RA - CLO

D

●	WT - WT/EAR2
♠	WT - EAR2
★	WT/EAR2 - EAR2

**Tabla 4.1. Esquema del primer día de realización de las pruebas englobadas en la batería de Fox.** (A) Tabla correspondiente a la cepa CD1, sujetos control, grupo tratado con ácido retinoico (RA) y tratado postnatalmente con clonidina (CLO). Nótese como el grupo tratado con clonidina mostró un retraso de forma generalizada en la realización de las pruebas. (B) Esquema relativo a la cepa C57BL/6, con los grupos silvestre (WT), heterocigoto (WT/EAR2) y homocigoto (EAR2). (C) Símbolos correspondientes a las diferencias estadísticamente significativas para los grupos control, tratado con ácido retinoico (RA) y tratado con clonidina (CLO). (D) Símbolos empleados para mostrar diferencias estadísticamente significativas en los grupos experimentales de la cepa C57BL/6: silvestre (WT), heterocigoto (WT-EAR2) y mutante (EAR2).

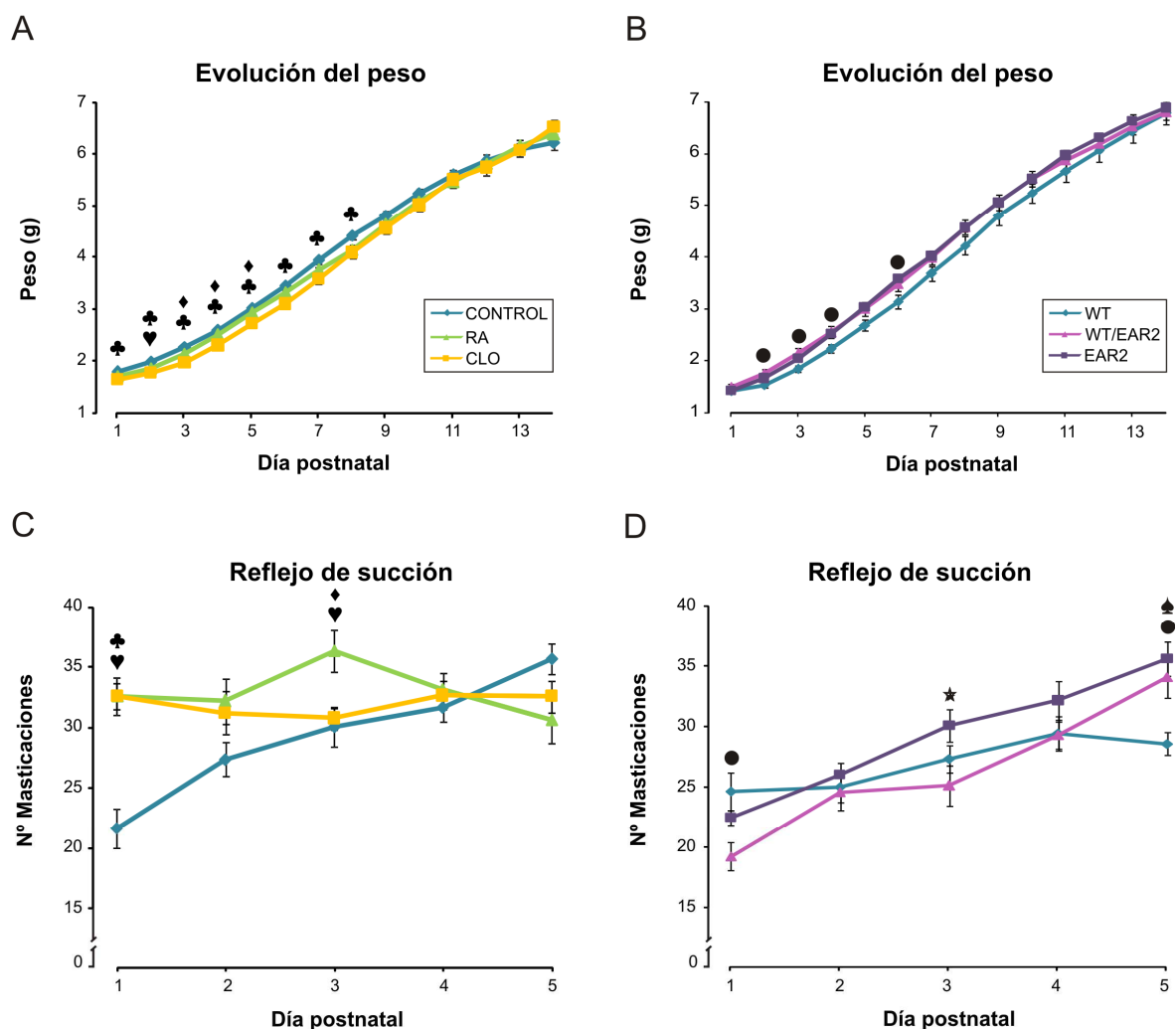
#### 4.2.2. Control del peso y reflejo de succión

En primer lugar, se hizo un seguimiento del peso de los grupos experimentales como medida de control del bienestar de los animales y como medida de posibles efectos de los distintos tratamientos o mutaciones en la fisiología o en la conducta alimenticia. Así, como se puede observar en la figura 4.3.A y B, todos los grupos se mantuvieron en unos valores de peso semejante. Sin embargo, los primeros días de experimentación, los animales tratados con clonidina mostraron un peso inferior a los sujetos control y los tratados con ácido retinoico ( $2,28 \pm 0,03$  g para los animales control,  $2,15 \pm 0,03$  g para los sujetos retinoicos y  $1,99 \pm 0,06$  g para el grupo tratado con clonidina, para el tercer día postnatal). A partir del día seis, estas diferencias significativas sólo se dieron entre el grupo control y los animales tratados con clonidina ( $p < 0,01$ ). No fue hasta el noveno día postnatal cuando los tres grupos de la cepa CD1 igualaron sus pesos, manteniéndose con valores muy similares hasta el final del procedimiento experimental (Figura 4.3.A).

En referencia a los animales de la cepa C57BL/6, como se puede observar en la figura 4.3.B, fueron los animales heterocigotos los que mostraron un peso mayor que los sujetos silvestres durante los primeros días experimentales ( $p < 0,05$ ), igualándose los tres grupos el séptimo día postnatal y continuando así hasta la finalización de las pruebas ( $6,06 \pm 0,22$  g para los animales silvestres,  $6,19 \pm 0,15$  g para los sujetos heterocigotos y  $6,31 \pm 0,11$  g para el grupo homocigoto EAR2, para el décimo segundo día postnatal).

Complementando a la medida del peso de los animales se realizó la prueba del reflejo de succión (Figura 4.3.C y D). Esta prueba no sólo evalúa una respuesta refleja ante un estímulo sensorial peribucal, sino que nos puede dar una idea de la frecuencia masticatoria del animal. En contra de lo que se podría deducir con los resultados obtenidos por el peso, los animales control de la cepa CD1, durante los primeros días, presentaron un menor número de masticaciones que los animales tratados con clonidina y con ácido retinoico, encontrándose el primer día diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, los animales control, fueron aumentando el número de masticaciones a medida que pasaron los días experimentales, mientras que los grupos tratados con ácido retinoico y con clonidina mostraron unos valores constantes a lo largo de los cinco días de duración de la prueba, igualándose así, el cuarto día postnatal, los valores de los tres grupos (Figura 4.3.C).

Los grupos mutantes EAR2, heterocigotos y homocigotos, y los ratones silvestres, fueron incrementando el número de masticaciones a medida que iban pasando los cinco días de realización de la prueba (figura 4.3.D). A pesar de esto, se hallaron diferencias estadísticamente significativas el primer día, en el que los animales silvestres presentaron un valor mayor que los sujetos heterocigotos ( $24,65 \pm 1,55$  número de masticaciones en 30 segundos para los silvestres frente a  $19,25 \pm 1,17$  nº masticaciones de los animales heterocigotos;  $p < 0,01$ ) y el quinto día en el que la diferencia de los heterocigotos se encontró con los animales homocigotos EAR2, que presentaron un mayor número de masticaciones ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, el último día de realización de la prueba fue el grupo control el que obtuvo unos valores de succión significativamente menores a los del grupo heterocigoto ( $p < 0,05$ ) y los animales homocigotos ( $p < 0,01$ ).





**Figura 4.3. Control del peso y reflejo de succión. (A) (B)** Evolución temporal del peso, medido en gramos, para cada uno de los grupos experimentales de la cepa CD1 (A) y la cepa C57BL/6 (B). Nótese como el noveno día postnatal el grupo tratado con ácido retinoico, los animales tratados postnatalmente con clonidina y los animales control alcanzaron el mismo peso aproximadamente, continuando con valores similares hasta el final de la prueba. Nótese también, como los animales mutantes heterocigotos presentaron un peso mayor que los animales silvestres durante los siete primeros días postnatales, representado por el símbolo ●. A partir del séptimo día postnatal los grupos mutantes, heterocigoto y homocigoto, y los animales silvestres alcanzaron los mismos valores de peso, continuando con valores similares hasta el último día de la prueba. **(C) (D)** Número de masticaciones realizadas en 30 segundos por los sujetos experimentales de los distintos grupos durante los cinco primeros días postnatales. (C) Cepa CD1, (D) Cepa C57BL/6. Nótese como los animales tratados con ácido retinoico y los tratados con clonidina mostraron un número de masticaciones constantes a lo largo de los días experimentales, mientras que el grupo control presentó una progresión a medida que pasaban los días de la prueba. Los animales mutantes, heterocigotos y homocigotos EAR2, y los ratones silvestres presentaron un mayor número de masticaciones a medida que pasaban los días experimentales. Nótese que el grupo homocigoto EAR2 mostró una leve tendencia a realizar un mayor número de masticaciones que los animales silvestres, presentando diferencias estadísticamente significativas el último día de la prueba, representado con el símbolo ▲.



#### 4.2.3. Evolución del sistema vestibular

Con el objetivo de hacer un seguimiento de la maduración del sistema vestibular se evaluó, en las pruebas de *Reflejo de giro*, *Vértigo* y *Geotaxia negativa*, englobadas dentro de la batería de Fox, la evolución de la ejecución de las pruebas durante la primera semana de vida postnatal.

Como se observa en la figura 4.4, de modo general, a medida que avanzaban los días experimentales, la mayor parte de los grupos de ambas cepas iban disminuyendo la latencia de realización de las pruebas vestibulares.

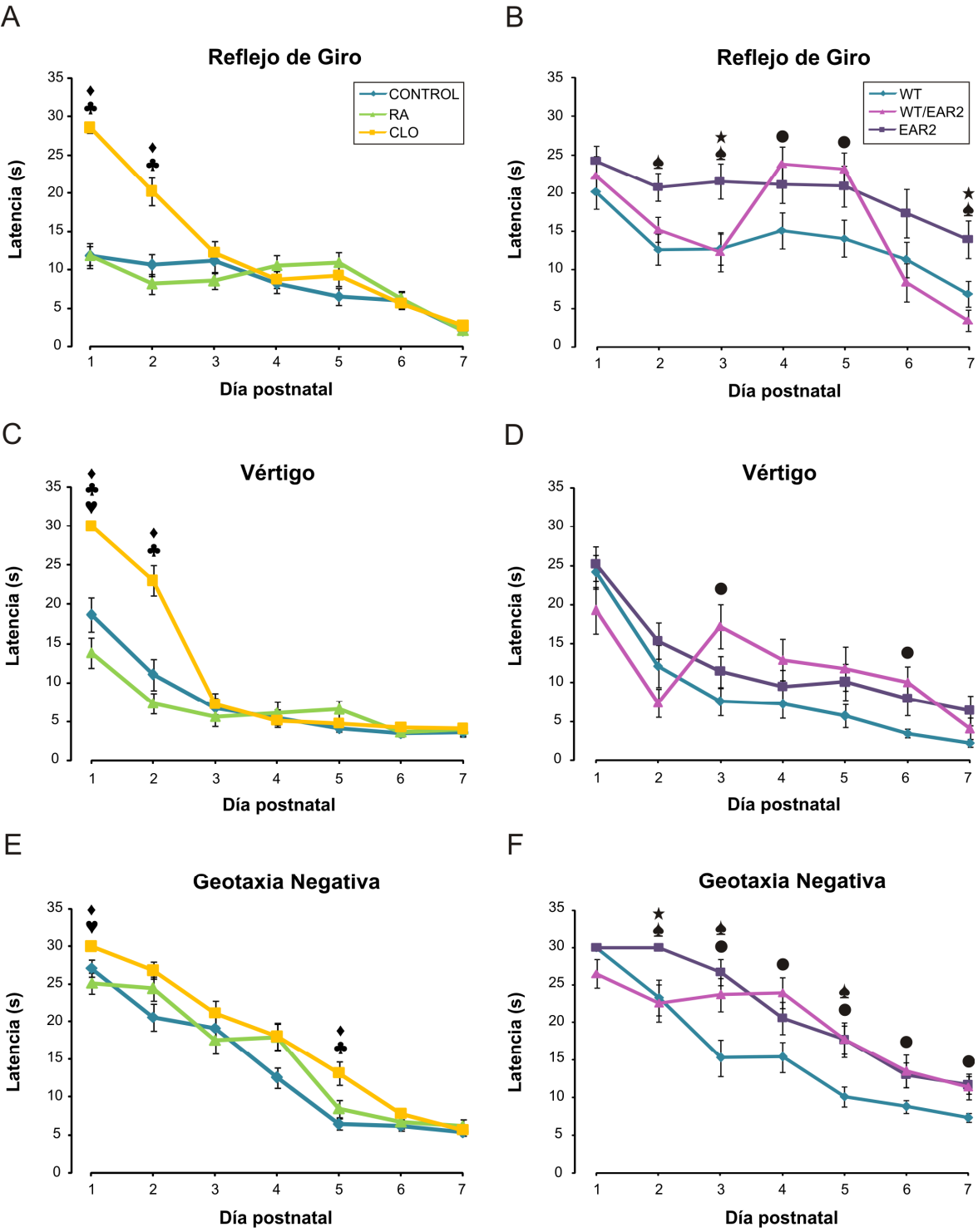
Para las pruebas de *Reflejo de giro* y *Vértigo* en los grupos de la cepa CD1 (figura 4.4.A y C), los animales tratados con clonidina mostraron un retraso significativo en la realización de dichas pruebas durante los primeros días frente a los animales control ( $p < 0,001$ ) y a los tratados con ácido retinoico ( $p < 0,001$ ). Para la prueba de *Geotaxia negativa*, el grupo clonidina también mostró una latencia mayor que los animales control, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Los animales mutantes homocigotos EAR2, al igual que el grupo tratado con clonidina, también mostraron una latencia mayor en la realización de las pruebas vestibulares con respecto al grupo silvestre ( $p < 0,05$ ) (figura 4.4.B,D,F). Llama la atención el comportamiento de los sujetos heterocigotos, los cuales mostraron un patrón de comportamiento distinto a los otros dos grupos, ya que en vez de disminuir su latencia de realización de las pruebas a medida que iban pasando los días experimentales, como

ocurrió en el grupo control y en el mutante homocigoto, los animales heterocigotos EAR2, durante los primeros días de la prueba, presentaron un comportamiento similar al grupo silvestre ( $12,68 \pm 1,99$  s para el grupo silvestre,  $12,34 \pm 2,50$  s del grupo heterocigoto y  $21,53 \pm 2,30$  s para los animales homocigotos EAR2 para el tercer día del *Reflejo de giro*), mientras que pasados los dos o tres primeros días, incrementó su latencia adquiriendo valores similares a los del grupo EAR2 ( $14,08 \pm 2,38$  s para los animales silvestres,  $23,11 \pm 2,19$  s del grupo heterocigoto y  $20,89 \pm 2,68$  s para los sujetos homocigotos EAR2 para el quinto día de la prueba de *Reflejo de giro*). Finalmente, pasando los últimos días en el caso de las pruebas de *Reflejo de giro* y *Vértigo*, a volver a tomar valores similares a los del grupo control ( $6,91 \pm 1,69$  s para los animales silvestres,  $3,47 \pm 1,41$  s del grupo heterocigoto EAR2 y  $13,97 \pm 2,43$  s para los sujetos homocigotos para el séptimo día de la prueba de *Reflejo de giro*).

---

**Figura 4.4. Sistema vestibular. (A), (B)** Medida de la latencia (en segundos) de la realización del giro para cada grupo experimental de las cepas CD1 (A) y C57BL/6 (B), frente a los días postnatales. Nótese como el grupo tratado con clonidina (CLO) mostró un retraso en la realización de la prueba en comparación con los sujetos control, representado por el símbolo ♣ y con los animales tratados con ácido retinoico (RA), representado por el símbolo ♦. a partir del tercer día postnatal (P3), los tres grupos presentaron valores similares de latencia de giro. En la cepa C57BL/6, los animales homocigotos (EAR2) presentaron una latencia de giro mayor que los ratones silvestres (WT), representado por el símbolo ♠. Nótese como el grupo heterocigoto (WT/EAR2) se comportó los primeros y últimos días de la prueba como el grupo control, mientras que en los días intermedios alcanzaron valores de latencia similares a los del grupo homocigoto. **(C), (D)** Latencia, medida en segundos, que empleó cada sujeto en dar un giro de  $90^\circ$ , alejándose del borde, durante los siete primeros días postnatales. (C) Cepa CD1. Nótese como los animales tratados con clonidina volvieron a mostrar el retraso en la realización de la prueba con respecto al grupo control. Mientras que los animales tratados con ácido retinoico mostraron una tendencia a presentar valores de latencia inferiores que el grupo control. Igualándose las latencias para los tres grupos en el tercer día postnatal, al igual que pasó con el reflejo de giro. (D) cepa C57BL6. Al igual que ocurría en la prueba de reflejo de giro, los animales homocigotos mostraron una tendencia a presentar valores de latencia mayores que los sujetos silvestres. Mientras que los ratones heterocigotos volvieron a repetir el comportamiento presentado en el reflejo de giro. **(E), (F)** Medida de la latencia, en segundos, empleada por cada uno de los grupos experimentales de las cepas CD1 (E) y C57BL6 (F) en realizar un giro de  $180^\circ$  sobre un plano inclinado durante los siete primeros días postnatales. Nótese como no existen a penas diferencias entre los grupos tratado con ácido retinoico, con clonidina y los sujetos control. Sin embargo, los animales tratados postnatalmente con clonidina mostraron una tendencia a presentar valores mayores de latencia que los animales control. Los animales mutantes, heterocigotos y homocigotos EAR2 tardaron más tiempo en realizar la prueba de Geotaxia negativa que los animales silvestres. Representado por los símbolos ● y ♠, respectivamente.

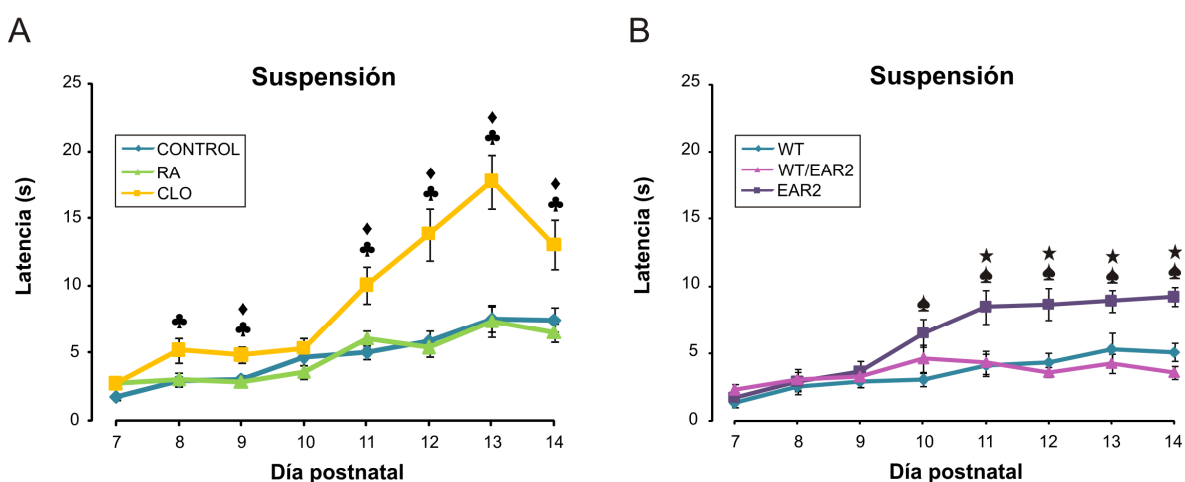


#### 4.2.4. Estudio de la fuerza muscular

Con el fin de medir la fuerza muscular de los grupos experimentales durante la etapa postnatal, se les realizó la prueba de *Suspensión*, incluida también en la batería de Fox.

Los animales de la cepa CD1 tratados con clonidina permanecieron más tiempo suspendidos sobre la cuerda tensada que los animales control y los tratados con ácido retinoico, que mostraron una latencia similar en los sucesivos días de realización de la prueba ( $5,88 \pm 0,82$  s para los animales control y  $5,39 \pm 0,65$  s del grupo tratado con ácido retinoico frente a  $13,81 \pm 1,91$  s para los sujetos tratados con clonidina para el décimo segundo día postnatal;  $p > 0,001$  para ambos casos) (Figura 4.5.A).

El grupo mutante homocigoto EAR2 de la cepa C57BL/6, al igual que ocurrió con el grupo clonidina en la cepa CD1, mostró una latencia significativa mayor de suspensión que los animales silvestres y los heterocigotos (figura 4.5.B), que presentaron valores similares de suspensión sobre la cuerda durante todos los días experimentales ( $5,26 \pm 1,25$  s para los animales silvestres y  $4,24 \pm 0,74$  s para los sujetos heterocigotos frente a  $8,91 \pm 0,83$  s de los sujetos homocigotos EAR2 para el décimo tercer día postnatal;  $p > 0,001$  para ambos casos).



**Figura 4.5. Suspensión.** Tiempo de permanencia suspendido sobre una cuerda tensada sujetándose con sus patas delanteras para cada uno de los sujetos experimentales durante el período comprendido entre el séptimo y el decimo cuarto día postnatal. (A) Cepa CD1. Nótese como los animales tratados con clonidina (CLO) permanecieron más tiempo suspendidos en la cuerda que los animales control y los animales tratados con ácido retinoico (RA). Se representa con los símbolos ♣ y ♦, respectivamente. (B) cepa C57BL6. Nótese como los animales homocigotos (EAR2) presentaron una latencia de permanencia mayor que los animales silvestres (WT) y los animales homocigotos (WT/EAR2). Se representa con los símbolos ♠ y ★, respectivamente.

#### 4.3. INTERVENCIÓN DEL SISTEMA ADRENÉRGICO EN LA ACTIVIDAD EXPLORATORIA POSTNATAL

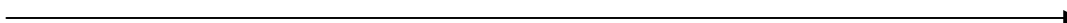
Una vez que los animales abrieron los ojos, se pasó a realizar las pruebas comportamentales de la segunda parte del procedimiento experimental. La primera de ellas fue la prueba de *Campo abierto*.

Con el fin de medir la influencia del sistema noradrenérgico en la actividad motora y exploratoria de los animales, se realizó la prueba del campo abierto durante diez minutos con el actímetro (Cibertec, S.A.) (ver Materiales y métodos).

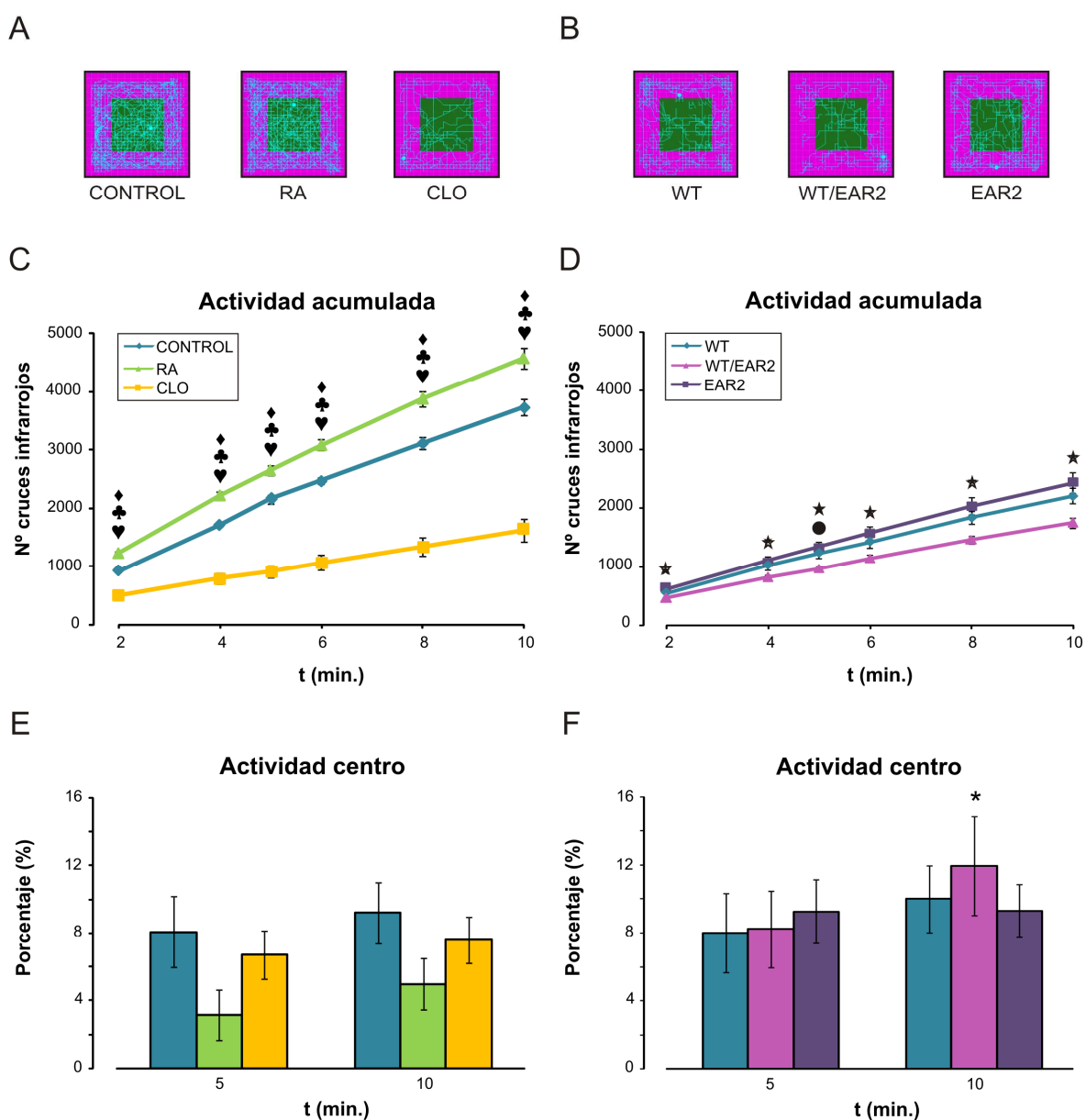
Como se puede observar en la figura 4.6.C y D, a medida que iban transcurriendo los minutos, los grupos experimentales incrementaron su actividad exploratoria. Sin embargo, no todos lo hicieron en la misma proporción. Así, en los ratones de la cepa CD1 (grupo tratado con ácido retinoico, animales tratados con clonidina y sujetos control) (figura 4.6.C), el grupo tratado con clonidina mostró una menor actividad frente a los animales control y a los tratados con ácido retinoico ( $p < 0,001$  en ambos casos), siendo éste último el que mostró una mayor actividad exploratoria total, existiendo diferencias

estadísticamente significativas también con el grupo control, el cual se mantuvo con valores intermedios ( $p < 0,001$ ).

En los animales de la cepa C57BL/6 (figura 4.6.D), la actividad exploratoria de los grupos mutantes EAR2, heterocigotos y homocigotos, y los sujetos silvestres fue menos diferenciada. Sin embargo, el grupo heterocigoto mostró una tendencia a realizar un menor número de cruces con los rayos infrarrojos que los animales silvestres y los sujetos homocigotos EAR2. Estos últimos presentaron una mayor actividad exploratoria que los animales heterocigotos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas durante toda la prueba ( $p < 0,01$ ).



**Figura 4.6. Actividad exploratoria.** (A) (B) Imagen obtenida del programa MUX\_XYZ16L (Cibertec, S.A.). La periferia del actímetro está representada en color rosa, mientras que el color verde muestra el centro de éste. La línea azul representa el recorrido total efectuado por un sujeto de cada grupo experimental de la cepa CD1 (A) y de la C57BL/6 (B) durante los diez minutos de realización de la prueba. (C) (D) Evolución temporal de la actividad acumulada, medida en número de veces que los animales de los distintos grupos experimentales cruzaron los rayos infrarrojos del actímetro, a lo largo de los 10 minutos de duración de la prueba de campo abierto. (C) Nótese como los animales tratados con ácido retinoico (RA), presentaron una actividad mucho mayor que los sujetos control, representado por el símbolo ♥. Los animales tratados con clonidina (CLO), por el contrario, mostraron valores inferiores a los obtenidos por el grupo control, presentando una hipoactividad ( $p < 0,001$ ). Esta diferencia estadísticamente significativa se representó por el símbolo ♣. (D) Los animales de la cepa C57BL/6 mostraron una actividad exploratoria más parecida. No obstante, los animales homocigotos (EAR2) mostraron una leve tendencia a presentar unos valores mayores de actividad que el grupo silvestre (WT). Mientras que los sujetos heterocigotos (WT/EAR2) presentaron una tendencia a tener unos valores de actividad menores que los del grupo silvestre. Sin embargo, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo heterocigoto y el homocigoto durante toda la prueba ( $p < 0,01$ ), representado por el símbolo ★. (E) (F) Histogramas que representan el tiempo (medido en porcentaje) que permanecieron en el centro del actímetro, con respecto al total, los animales de los distintos grupos experimentales de la cepa CD1 (E) y C57BL/6 (F). Nótese como los animales tratados con ácido retinoico mostraron una tendencia a permanecer menos tiempo en el centro del actímetro que el grupo control. Nótese también, como los animales heterocigotos EAR2 aumentaron el porcentaje del tiempo total en el centro del actímetro a los 10 minutos de la prueba, representado por el símbolo \*.



Como medida de la ansiedad, se estudió la actividad exploratoria en el centro del actímetro. Al observar la figura 4.6.E y F, se puede ver que para ambas cepas no existieron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales en el tiempo empleado en el centro del actímetro a los 5 y a los 10 minutos. Sin embargo, el grupo tratado con ácido retinoico mostró una tendencia a permanecer menos tiempo en el centro, presentando un mayor nivel de ansiedad, frente a los otros dos grupos de la cepa CD1 (grupos tratado con clonidina y sujetos control) ( $8,07 \pm 2,12$  % tiempo en el centro para los animales control y  $6,70 \pm 1,42$  % para los sujetos tratados con clonidina frente a  $3,14 \pm 1,47$  % del tiempo que permanecieron en el centro los sujetos retinoicos, a los 5

minutos de la prueba;  $p$  (Control- RA) = 0,132,  $p$  (RA-CLO) = 0,428) (figura 4.6.E). Por otro lado, el grupo heterocigoto de la cepa C57BL/6, mostró una mayor actividad en el centro a los 10 minutos en comparación con el empleado hasta el minuto 5, representado en la figura 4.6.F con el símbolo \* ( $p$  = 0,032), lo que indicaría que su nivel de ansiedad fue menor.

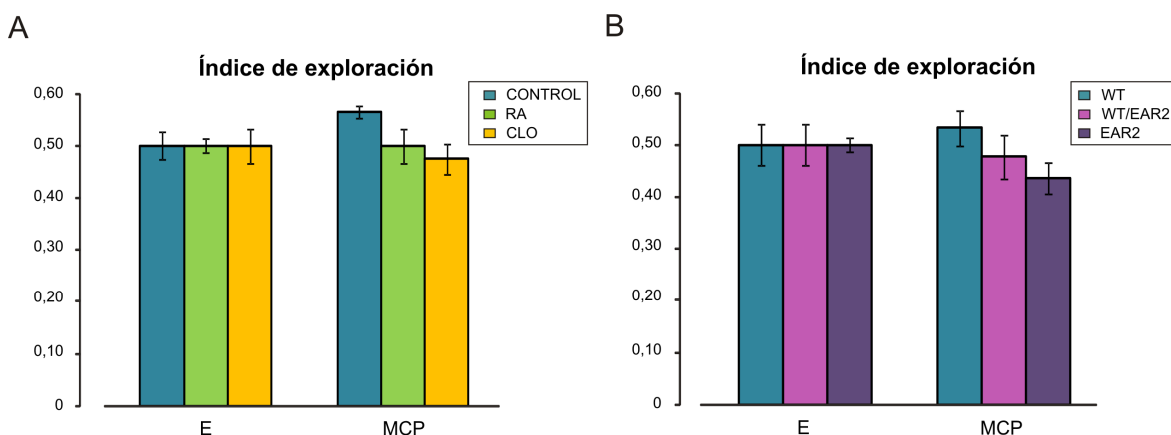
#### 4.4. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DEL SISTEMA ADRENÉRGICO Y LA MEMORIA POSTNATAL

Para evaluar los procesos de atención y memoria y las posibles anomalías en éstos tras las distintas alteraciones en el sistema adrenérgico, se realizó la prueba de *Reconocimiento de objetos* (ver Materiales y métodos). La figura 4.7 muestra el índice de exploración de los objetos para los grupos experimentales durante las sesiones de entrenamiento (E) y memoria a corto plazo (MCP).

Todos los grupos experimentales presentaron un índice de exploración de 0,5 en la sesión de entrenamiento, lo que significó que exploraron ambos objetos un mismo número de veces. Fue en la sesión de la memoria a corto plazo, realizada una hora más tarde, donde hubo diferencias entre los grupos experimentales. Así, como se puede observar en la figura 4.7.A, tanto los animales tratados con ácido retinoico como los tratados con clonidina, mostraron unos valores similares de exploración tanto para el objeto conocido como para el objeto novedoso en la memoria a corto plazo. En contraposición a esto, los sujetos control mostraron una tendencia a explorar más el objeto novedoso frente al conocido ( $0,57 \pm 0,01$  % del índice de exploración) frente a los valores de exploración del objeto novedoso obtenidos por los sujetos retinoicos ( $0,50 \pm 0,03$  % del índice de exploración) y a los mostrados por los ratones tratados con clonidina ( $0,48 \pm 0,03$  % del índice de exploración). Sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Para los animales de la cepa C57BL/6 se dio el mismo caso que para los grupos de la cepa CD1. Los sujetos silvestres mostraron una mayor exploración del objeto novedoso frente a los animales heterocigotos, que mostraron un índice de exploración similar al obtenido en la sesión de entrenamiento y al grupo homocigoto EAR2, cuyo índice incluso disminuyó con respecto al mostrado en la primera sesión ( $0,43 \pm 0,03$  % del índice de exploración). En cualquier caso, las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas.





**Figura 4.7. Memoria.** Número de contactos realizados por cada sujeto sobre el objeto novedoso, con respecto al total de contactos (Índice de exploración), para cada una de las sesiones incluidas en la prueba de *Reconocimiento de objetos* (entrenamiento (E) y memoria a corto plazo (MCP)). (A) Cepa CD1. Nótese como los animales tratados con ácido retinoico (RA) y los sujetos tratados con clonidina (CLO) presentaron un índice de exploración en la memoria a corto plazo similar a la obtenida en la sesión de entrenamiento. Por el contrario, el grupo control obtuvo un mayor índice de exploración en la MCP que en la sesión de entrenamiento. (B) Cepa C57BL/6. Nótese como los animales heterocigotos y homocigotos EAR2 presentaron unos valores de índice de exploración en la MCP similares a la sesión de E. Incluso, los animales homocigotos mostraron una tendencia a presentar valores incluso inferiores. Al igual que pasaba con los animales control de la cepa CD1, los animales silvestres de la cepa C57BL/6, presentaron un mayor número de contactos con el objeto novedoso en la sesión de MCP en comparación con la sesión de entrenamiento. Un índice de exploración de 0,5 indica que el animal exploró ambos objetos un mismo número de veces, mientras que un índice mayor de 0,5 indica que contactó más con el objeto nuevo.

#### 4.5. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL SISTEMA ADRENÉRGICO EN LA ANALGESIA POSTNATAL

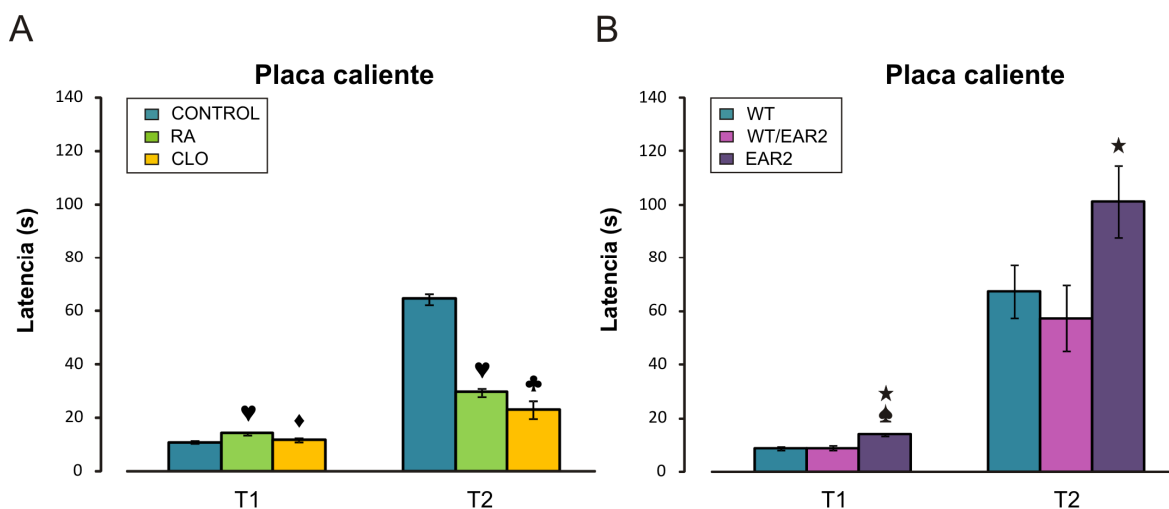
La última de las pruebas del segundo bloque del procedimiento experimental para los animales neonatos fue la *Prueba de analgesia* o de la *placa caliente*.

Para estudiar las posibles alteraciones producidas en la percepción del dolor tras interferir en el sistema adrenérgico, se realizó la prueba de la *Placa caliente*. En la figura 4.8, se muestra la latencia, en segundos, de la variable T1, adoptada como medida del umbral doloroso. Esta variable representa el tiempo que tardó el animal en lamerse las patas por primera vez, para los distintos grupos experimentales. También se estudió la variable de respuesta comportamental al dolor, simbolizado por el acrónimo T2. Esta variable representa el tiempo que tardó el animal en intentar escapar de la placa caliente alzándose tres veces apoyado en una de las paredes o dando un salto (ver Materiales y métodos)).

En referencia al umbral doloroso, se vio que el grupo de la cepa CD1 tratado con ácido retinoico tuvo una latencia significativamente superior ( $14,23 \pm 0,38$  s) a la obtenida tanto por el grupo control ( $11,08 \pm 0,54$  s;  $p = 0,001$ ) como por el grupo tratado con clonidina ( $11,74 \pm 0,80$  s;  $p = 0,014$ ) (figura 4.8.A).

Para la cepa C57BL/6, como se puede observar en la figura 4.8.B, fue el grupo mutante homocigoto el que mostró una latencia de respuesta de umbral doloroso mayor respecto a los otros dos grupos experimentales ( $14,01 \pm 0,43$  s para el grupo homocigoto EAR2 frente a  $8,77 \pm 0,64$  s de los sujetos silvestres y  $9,02 \pm 0,93$  s para el grupo heterocigoto EAR2; siendo  $p > 0,001$  en ambos casos).

En cuanto a la respuesta comportamental al dolor, T2, el grupo control de la cepa CD1, mostró una mayor latencia de escape de la placa caliente ( $64,51 \pm 2,08$  s) frente a las obtenidas por los grupos tratados con ácido retinoico ( $29,67 \pm 1,48$  s) y con clonidina ( $23,11 \pm 3,48$  s) ( $p < 0,001$  en ambos casos). El mismo caso se dio con el grupo mutante homocigoto EAR2 para la cepa C57BL/6, que tardó más tiempo en escapar de la placa caliente ( $101,22 \pm 13,40$  s) que los animales silvestres ( $67,40 \pm 9,93$  s) y los sujetos heterocigotos ( $57,35 \pm 12,14$  s). Sin embargo sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los animales heterocigotos y los mutantes homocigotos EAR2 ( $p = 0,050$ ).



**Figura 4.8. Placa caliente.** Representación del tiempo (en segundos) que tardaron los sujetos experimentales en lamerse las patas por primera vez (umbral doloroso, T1) y la latencia que emplearon en mostrar una respuesta de huida frente al dolor (respuesta comportamental al dolor, T2). (A) Cepa CD1. Nótase como los animales tratados con ácido retinoico (RA) tardaron más tiempo que los animales control y los tratados con clonidina (CLO) en lamerse las patas por primera vez. Se representa con el símbolo ♥ y ♦, respectivamente. Para la variable T2 fueron los animales control los que mostraron una latencia mayor de huida frente a los sujetos RA y a los CLO. Representados por los símbolos ♥ y ♣, respectivamente. (B) Cepa C57BL/6. Nótase como los animales homocigotos (EAR2) presentaron una mayor latencia para las variables T1 y T2 que las obtenidas por los animales silvestres (WT) y los sujetos heterocigotos EAR2 (WT/EAR2). Se representa por los símbolos ♣, ★, respectivamente.

#### 4.6. PARTICIPACIÓN DEL LOCUS COERULEUS EN LA ACTIVIDAD MOTORA DEL MUTANTE EAR2 ADULTO

Con el fin de evaluar el efecto a largo plazo, se hizo una serie de pruebas complementarias en los animales silvestres, heterocigotos y homocigotos EAR2 de la cepa C57BL/6 a los tres meses de edad.

##### 4.6.1. Prueba del *Campo abierto*

Al igual que en el caso de los animales neonatos, se quiso evaluar la influencia del sistema adrenérgico en la actividad motora y exploratoria de los sujetos adultos, a través de la prueba del campo abierto. Así, como se puede observar en la figura 4.9.B, el grupo silvestre y los grupos mutantes EAR2, heterocigoto y homocigoto, fueron aumentando su actividad a lo largo de la prueba, obteniendo pendientes muy similares. Sin embargo, a diferencia de lo que sucedió en los animales neonatos, el grupo homocigoto EAR2 fue el que mostró un incremento menor en la actividad exploratoria con respecto al grupo

heterocigoto encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos ( $p < 0,05$ ). De este modo, el grupo control permaneció, al igual que pasó en la prueba del actímetro de los animales neonatos, con valores intermedios entre los dos grupos mutantes EAR2.

En lo referente a la actividad en el centro del actímetro, los sujetos de los tres grupos mostraron unos valores similares a los cinco y diez minutos de realización de la prueba. Sin embargo, los animales heterocigotos permanecieron más tiempo en el centro del actímetro a los diez minutos en comparación con el obtenido a los cinco minutos, representado en la figura 4.9.C con el símbolo \* ( $9,57 \pm 2,65$  % del tiempo total en el centro a los 5 minutos frente a  $13,51 \pm 2,71$  % del tiempo total a los 10 minutos;  $p = 0,001$ ). Se observa, por lo tanto, un comportamiento similar al obtenido en los animales neonatos.

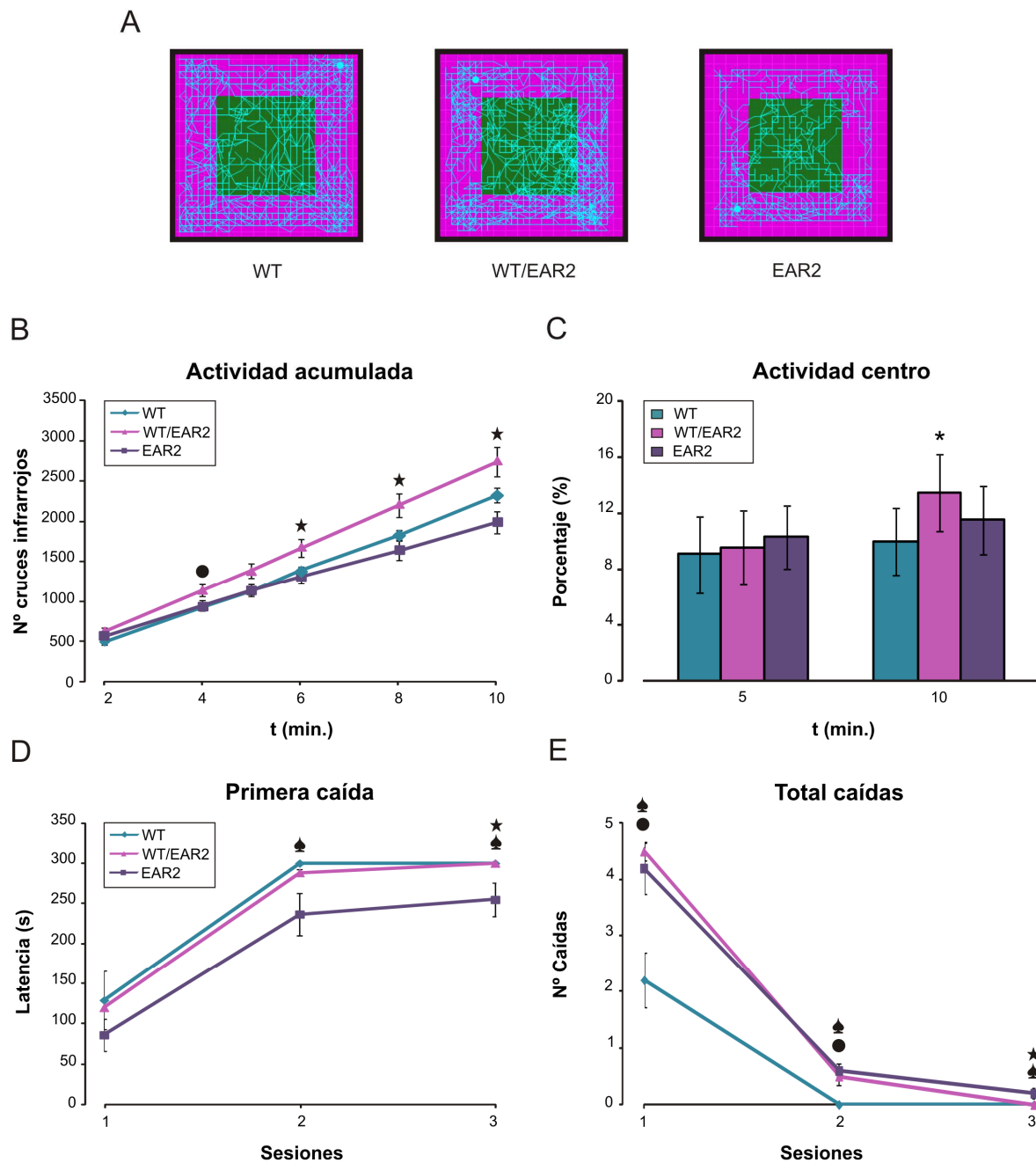
#### **4.6.2. Prueba del Rotarod o cilindro rotatorio**

Con la prueba del Rotarod, se evaluaron el comportamiento y el aprendizaje motor de los ratones silvestres, los heterocigotos y los homocigotos EAR2. Esta prueba evalúa, además del aprendizaje, la coordinación motora y equilibrio, además de la fuerza muscular.

Como muestra la figura 4.9.D, los animales mutantes, heterocigotos y homocigotos EAR2, y los sujetos silvestres fueron aumentando la latencia de la primera caída del cilindro rotatorio conforme pasaban las sesiones. Sin embargo, los animales homocigotos EAR2 permanecieron menos tiempo en el Rotarod que los ratones silvestres en la segunda sesión de la prueba ( $236,61 \pm 26,32$  s para los animales homocigotos EAR2 frente a  $300,00 \pm 0,00$  s de los animales silvestres;  $p = 0,021$ ). Para la tercera sesión, el grupo homocigoto EAR2 fue el que menor latencia a la primera caída tuvo, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre éstos y el grupo silvestre y el heterocigoto ( $p = 0,045$  para ambos casos).

Para complementar la variable anterior, se estudió también el número total de caídas de los animales en las tres sesiones de la prueba del Rotarod. En la figura 4.9.E se puede observar como los ratones silvestres presentaron un menor número de caídas en la primera y la segunda sesión ( $2,20 \pm 0,49$  nº caídas en la primera sesión y  $0,00 \pm$

0,00 n° caídas para la segunda sesión) que los animales heterocigotos ( $4,50 \pm 0,17$  n° caídas en la primera sesión;  $p = 0,001$  y  $0,50 \pm 0,17$  n° caídas para la segunda sesión;  $p = 0,16$ ) y el grupo homocigoto EAR2 ( $4,20 \pm 0,46$  n° caídas en la primera sesión;  $p = 0,004$  y  $0,60 \pm 0,12$  n° caídas para la segunda sesión;  $p = 0,004$ ). En la tercera sesión fue el grupo homocigoto el que mostró un mayor número de caídas frente a los otros dos grupos experimentales ( $p = 0,45$  en ambos casos).



**Figura 4.9. Actividad motora. (A)** Imagen obtenida del programa MUX\_XYZ16L (Cibertec, S.A.). El color rosa muestra la periferia del actímetro frente al centro de éste representado en color verde. La línea azul muestra el recorrido total realizado durante los 10 minutos de duración de la prueba del actímetro por un sujeto de cada grupo experimental, (WT = silvestre, WT/ EAR2 = heterocigoto, EAR2 = mutante). **(B)** Evolución temporal de la actividad acumulada, medida en número de veces que los animales de los distintos grupos experimentales cruzaron los rayos infrarrojos del actímetro, a lo largo de los 10 minutos de duración de la prueba de campo abierto. Nótese como, en este caso, los animales heterocigotos adultos mostraron una tendencia a cruzar un mayor número de veces los haces infrarrojos que los animales silvestres. Los sujetos homocigotos, por el contrario, mostraron una tendencia a presentar una menor actividad acumulada que los sujetos silvestres. Sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los sujetos heterocigotos y los homocigotos EAR2 ( $p < 0.05$ ), representada por el símbolo ★. **(C)** Histogramas que representan el tiempo (medido en porcentaje) que permanecieron en el centro del actímetro, con respecto al total, los animales de los distintos grupos experimentales. Nótese como a penas existieron diferencias entre los grupos. Sin embargo, los ratones heterocigotos EAR2 mostraron una mayor latencia a permanecer en el centro del actímetro a los 10 minutos en comparación con la obtenida a los 5 minutos, representado por el símbolo \*. **(D)** Latencia de la primera caída, medida en segundos, para cada una de las sesiones experimentales de la prueba del *Rotarod* para los grupos silvestre, heterocigoto y homocigoto EAR2. Nótese como los animales mutantes homocigotos mostraron un menor tiempo de permanencia en el cilindro rotatorio que los ratones silvestres ( $p < 0.05$ ), representado por el símbolo ♠. **(E)** Representación del número total de caídas para cada uno de los grupos experimentales en las tres sesiones de la prueba del *Cilindro rotatorio*. Obsérvese como los ratones silvestres presentaron un menor número de caídas que los animales mutantes heterocigoto y homocigotos en las distintas sesiones experimentales ( $p < 0.05$ ), representado por los símbolos ● y ♠, respectivamente.

En su conjunto, los resultados obtenidos en las pruebas motoras realizadas, mostraron una alteración en las capacidades motoras generales de los ratones con la mutación homocigota EAR2.

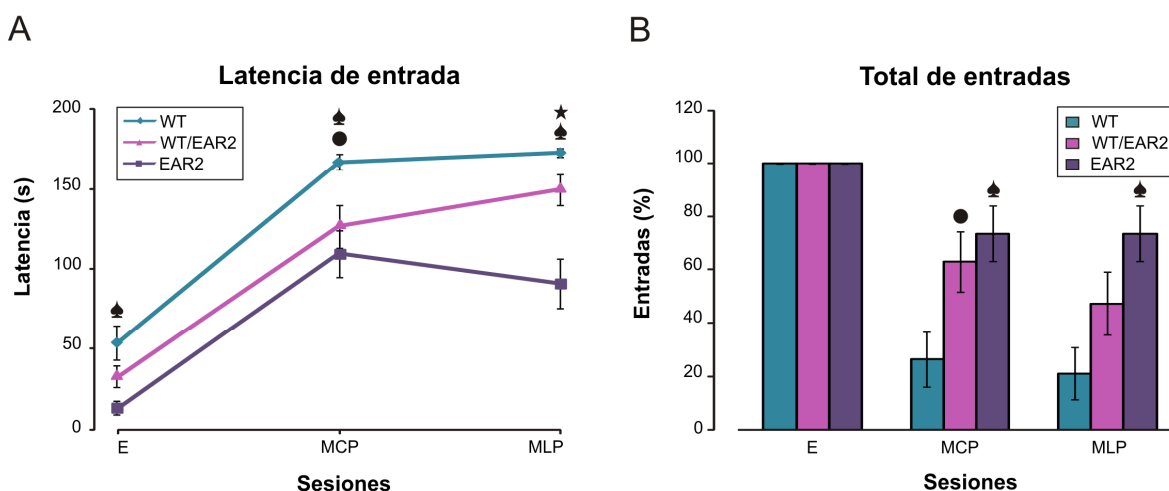
## 4.7. CURSO TEMPORAL DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA EN EL MUTANTE EAR2 ADULTO

### 4.7.1. Prueba de la *Evitación pasiva*

Tras el estudio del comportamiento motor, se pasó a la realización de una serie de pruebas relacionadas con distintos tipos de memoria. La primera de estas pruebas fue la *Evitación pasiva* como medida de un tipo de memoria emocional que suele implicar la participación de la amígdala. Como se puede observar en la figura 4.10.A, los animales silvestres mostraron una latencia significativamente mayor en el compartimento con luz, para la memoria a corto plazo (MCP) frente a los ratones heterocigotos ( $p = 0.050$ ) y los animales mutantes homocigotos EAR2 ( $p = 0.003$ ), que entraron con mayor rapidez al compartimento oscuro ( $166,80 \pm 4,78$  s para el grupo WT frente a  $126,42 \pm 13,51$  s del grupo WT/ EAR2 y  $109,44 \pm 14,38$  s para los animales mutantes). En la sesión de memoria a largo plazo (MLP), se volvieron a repetir los resultados obtenidos en la anterior sesión para los animales silvestres y los sujetos homocigotos. Los ratones homocigotos

EAR2 mostraron una mayor rapidez de entrada en el compartimento oscuro frente a los animales silvestres ( $172,84 \pm 2,86$  s para los ratones silvestres frente a  $90,75 \pm 15,51$  s de los animales homocigotos EAR2;  $p < 0,001$ ). Sin embargo, para esta sesión, los animales heterocigotos obtuvieron una latencia de permanencia en el compartimento claro similar a la obtenida por los animales silvestres ( $149,42 \pm 9,76$  s), y significativamente mayor que la presentada por los animales homocigotos EAR2 ( $p = 0,001$ ).

Como complemento a la variable de latencia en el compartimento con luz, se estudió el porcentaje total de entradas de los distintos grupos para las tres sesiones experimentales. Así, como se puede observar en la figura 4.10.B, todos los animales entraron en el compartimento oscuro en la primera sesión de la prueba, mientras que para la sesión de memoria a corto plazo, sólo el  $26,32 \pm 10,38$  por ciento de los animales silvestres entraron en la caja oscura frente al  $63,16 \pm 11,37$  por ciento de los sujetos heterocigotos ( $p = 0,050$ ) y el  $73,68 \pm 10,38$  por ciento de los ratones homocigotos EAR2 ( $p = 0,009$ ). Para la sesión de memoria a largo plazo, los resultados obtenidos entre los grupos en la sesión anterior se repitieron, entrando un  $21,05 \pm 9,61$  por ciento de los sujetos silvestres frente al  $47,37 \pm 11,77$  por ciento de los animales heterocigotos y al  $73,68 \pm 10,38$  por ciento de los ratones homocigotos EAR2. Sin embargo, sólo se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los ratones silvestres y los homocigotos EAR2 ( $p = 0,003$ ).



**Figura 4.10. Evitación pasiva.** (A) Latencia empleada por cada uno de los grupos experimentales en cruzar al compartimento oscuro en cada una de las tres sesiones correspondientes a la prueba de la *Evitación pasiva* (entrenamiento, memoria a corto (MCP) y a largo plazo (MLP)). Nótese como los animales homocigotos (EAR2) presentaron una latencia de entrada menor que los sujetos silvestres (WT) para todas las sesiones de la prueba, representado por el símbolo ♠. Los animales heterocigotos (WT/EAR2) entraron antes en la cámara oscura que los ratones silvestres en la sesión de MCP, representado por el símbolo ●; sin embargo, en la MLP alcanzó valores similares a los sujetos silvestres. (B) Representación, en porcentaje, de las entradas realizadas por cada grupo al compartimento oscuro en las distintas sesiones de las que constó la prueba de *Evitación pasiva*. Nótese como los animales silvestres presentaron un menor número de entradas al compartimento oscuro que los grupos mutantes, heterocigoto y homocigoto, para las dos sesiones de memoria de la prueba.

#### 4.7.2. Prueba de la *Inhibición por prepulso*

Con el fin de valorar la magnitud y latencia de la respuesta de sobresalto de los grupos experimentales se analizó el valor medio del pico (VMP) y el valor medio de latencia de respuesta (VMLR) en la llamada línea base (30 primeros pulsos administrados de 125 dB durante 100 ms). Así se puede observar en la figura 4.11.A como los animales mutantes homocigotos EAR2 mostraron un valor del pico significativamente menor que los ratones silvestres ( $p = 0,023$ ) y los animales heterocigotos ( $p < 0,001$ ), no existiendo diferencias entre estos dos últimos grupos. Para la variable VMLR los tres grupos experimentales presentaron valores de latencia similares, no encontrando diferencias significativas entre ellos.

A continuación, se estudió la inhibición de la respuesta de sobresalto tras la aplicación de un prepulso de 85 dB y 50 ms de duración. Para analizar esta inhibición se utilizó la fórmula matemática incluida en el artículo de López-Ramos y cols., 2010:



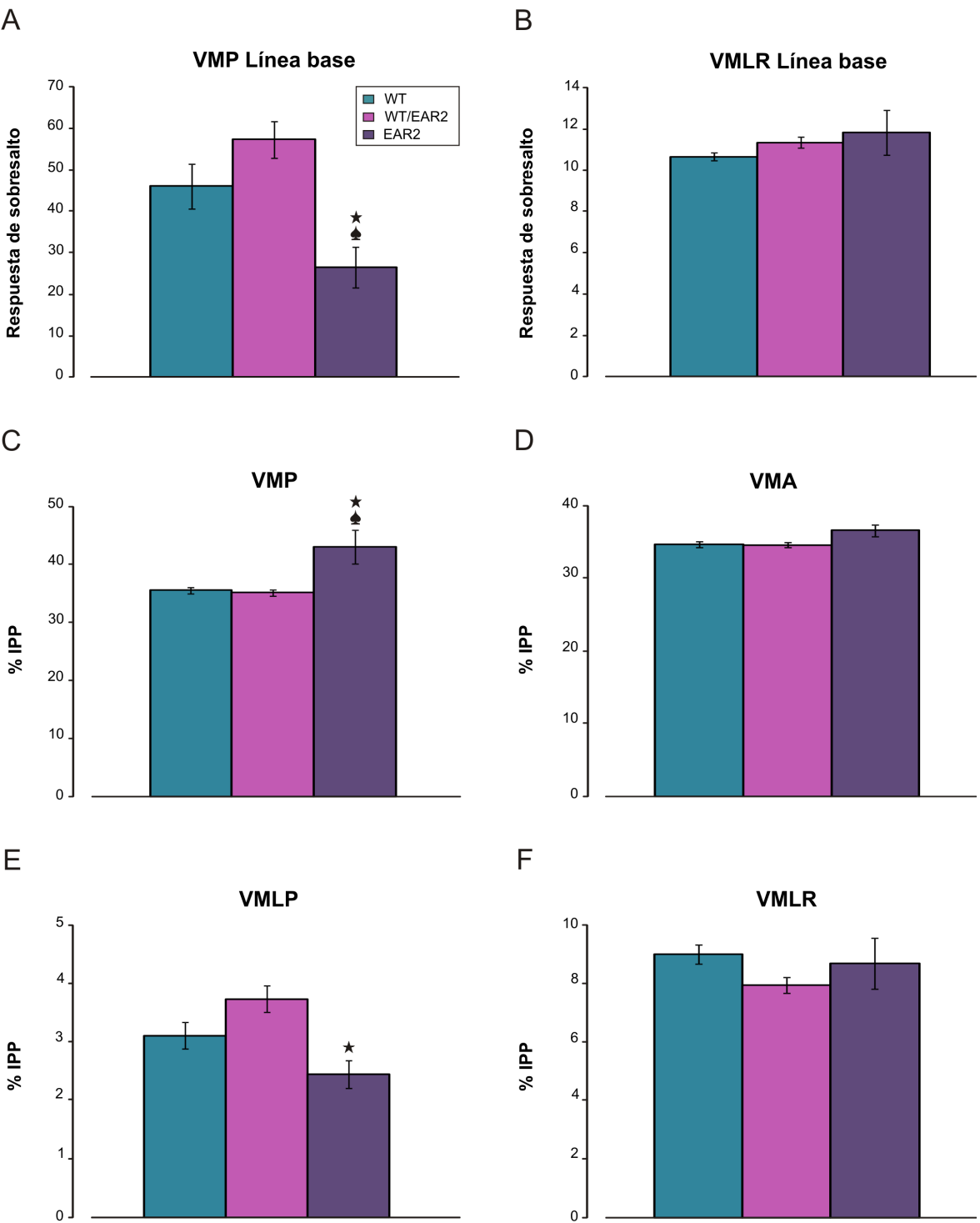
( $IPP = \frac{\text{Startle/Prepulso}}{\text{Línea base}} \times 100$ ). Además de la inhibición para las variables nombradas

anteriormente, VMP y VMLR, también se analizó si el prepulso inhibía el valor medio del área de respuesta (VMA) y el valor medio de latencia al pico (VMLP) (figura 4.11C-4.11F).

Observando la figura 4.11.C, se puede ver como los animales homocigotos EAR2 mostraron un valor significativamente mayor de inhibición para el valor del pico que los ratones silvestres ( $p = 0,015$ ) y el grupo heterocigoto ( $p = 0,009$ ), obteniendo estos dos últimos grupos valores al pico muy similares ( $35,54 \pm 0,58$  para el grupo silvestre frente a  $35,09 \pm 0,54$  del grupo heterocigoto). Sin embargo, para la inhibición por prepulso del valor medio del área de respuesta (VMA), variable con la que se mide también la magnitud de respuesta, no se vieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ( $34,54 \pm 0,40$  para el grupo WT,  $34,52 \pm 0,38$  para los animales heterocigotos frente a  $36,51 \pm 0,88$  del grupo EAR2) (figura 4.11.D).

En la figura 4.11.E, se muestra como la inhibición por prepulso del valor medio de latencia al pico fue más baja para los animales mutantes homocigotos que la obtenida por los ratones heterocigotos EAR2, encontrándose los animales silvestres con valores intermedios entre ambos. Sin embargo, sólo se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo heterocigoto y el homocigoto EAR2 ( $p = 0,001$ ). ( $3,10 \pm 0,23$  para los animales silvestres,  $3,73 \pm 0,22$  de los ratones heterocigotos frente a  $2,43 \pm 0,23$  del grupo homocigoto EAR2).

No obstante, para la inhibición de la latencia de respuesta, al igual que sucedió en la línea base, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (figura 4.11.F).





**Figura 4.11. Sobresalto e Inhibición por prepulso.** (A) Histograma que representa el valor medio al pico (VMP) obtenido en la línea base, en los 30 primeros pulsos administrados. Nótese como los animales homocigotos (EAR2) presentaron un valor al pico menor que los animales silvestres (WT) y los sujetos heterocigotos (WT/EAR2). Se representa con los símbolos ♠ y ★, respectivamente. (B) Respresentación del valor medio de latencia de respuesta (VMLR) obtenido en los 30 primeros pulsos administrados, consiguiendo así las respuestas de la línea basal. Nótese como no existió diferencias entre los valores obtenidos por los distintos grupos experimentales. (C) Histograma que representa el porcentaje de inhibición por un prepulso de 85 dB y 50 ms de duración, para el valor medio al pico (VMP) obtenido por los grupos experimentales durante los 45 minutos de duración de la prueba. Nótese como los animales homocigotos presentaron mayores valores de inhibición por prepulso del VMP que los sujetos silvestres y los heterocigotos. Se representa con los símbolos ♠ y ★, respectivamente. (D) Representación del porcentaje de inhibición por prepulso (IPP) para el valor medio del área (VMA) presentada por los ratones de los distintos grupos experimentales en la prueba de Inhibición por prepulso. Nótese como no se hallaron diferencias significativas entre los grupos experimentales. (E) Histograma que muestra la inhibición por prepulso (IPP) de la latencia al pico (VMLP) analizada para los tres grupos de ratones. Nótese como los animales homocigotos presentaron una tendencia de menor IPP que los animales silvestres y que los sujetos heterocigotos. Sin embargo, sólo se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos mutantes, representadas por el símbolo ★. (F) Representación del porcentaje de inhibición por prepulso para la latencia de respuesta (VMLR) presentada por los animales de los distintos grupos experimentales en la prueba de Inhibición por prepulso. Nótese como no existieron diferencias entre los animales silvestres y los grupos mutantes EAR2.

#### 4.7.3. Condicionamiento operante: *la jaula de Skinner*

La siguiente prueba de memoria que se realizó fue la *jaula de Skinner*, correspondiente a un condicionamiento operante. Lo primero que se quiso estudiar fue el número de días que necesitaron los animales de cada grupo experimental para aprender la asociación palanca-comida. Se hizo con un programa de reforzamiento RF1, es decir, cada vez que el animal presionó la palanca se le recompensó con una bolita de comida (pelet). Se consideró aprendida esta asociación cuando el animal alcanzó el criterio establecido de presionar veinte o más veces la palanca en una misma sesión de condicionamiento. Así se puede observar en la figura 4.12.A como los animales silvestres necesitaron  $4,57 \pm 0,30$  días para aprender la asociación, resultados similares a los obtenidos por el grupo heterocigoto ( $5,14 \pm 0,59$  días). Los animales homocigotos EAR2 mostraron una tendencia a alcanzar este criterio en un menor número de días, necesitando  $3,71 \pm 0,29$ . Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Además de evaluar si los animales eran capaces de adquirir una tarea simple de condicionamiento instrumental, también se comprobó si los ratones eran capaces de aprender una tarea de condicionamiento operante, pero utilizando la luz (que emitía un LED situado sobre la palanca) como estímulo discriminativo. La luz señalaba el periodo durante el cual la acción de presionar la palanca daba como resultado la obtención de un

pelet. Cada sesión duraba 20 minutos. Durante 20 segundos, más un tiempo aleatorio de 1 a 10 segundos, la luz permanecía apagada. Durante este periodo, si el animal presionaba la palanca, no obtenía ninguna recompensa. Además, si el animal presionaba la palanca durante el tiempo aleatorio, la luz permanecería apagada durante más tiempo como penalización. Tras el periodo de oscuridad, se encendía la luz durante 20 segundos y si el animal presionaba la palanca durante este tiempo, era recompensado con una bolita de comida. Se utilizó el coeficiente de luz/oscuridad para evaluar el aprendizaje de la tarea. El coeficiente alcanzó el valor 0 cuando el número de presiones de la palanca durante el periodo de oscuridad eran iguales al número de presiones de palanca durante el periodo de luz.

Como se puede observar en la figura 4.12.B, los animales adquirían la tarea a medida que eran sometidos a las sesiones de condicionamiento, de manera que durante la sexta y séptima sesión presionaban la palanca más veces en el periodo de luz que en el de oscuridad. Sin embargo, los animales homocigotos EAR2 mostraron un índice de luz/ oscuridad significativamente menor que el obtenido por los otros dos grupos para los últimos días de condicionamiento ( $p < 0,05$ ). Así, por ejemplo para el sexto día de condicionamiento, los ratones silvestres tuvieron un coeficiente de luz/ oscuridad de  $0,46 \pm 0,08$ , similar al obtenido por el grupo heterocigoto, con un índice de  $0,37 \pm 0,11$ . Sin embargo, los ratones mutantes homocigotos EAR2 presentaron un coeficiente de  $0,04 \pm 0,04$ , lo que significó que presionaron la palanca aproximadamente el mismo número de veces cuando la jaula estaba a oscuras que cuando estaba iluminada, frente a los animales silvestres ( $p = 0,005$ ) y los ratones heterocigotos ( $p = 0,030$ ), que presionaron la palanca un mayor número de veces cuando la luz de la jaula de Skinner estaba encendida. Esto indica que los ratones mutantes homocigotos EAR2 no aprendieron la asociación contextual luz- disponibilidad de comida.

#### **4.7.4. Prueba del Reconocimiento de objetos**

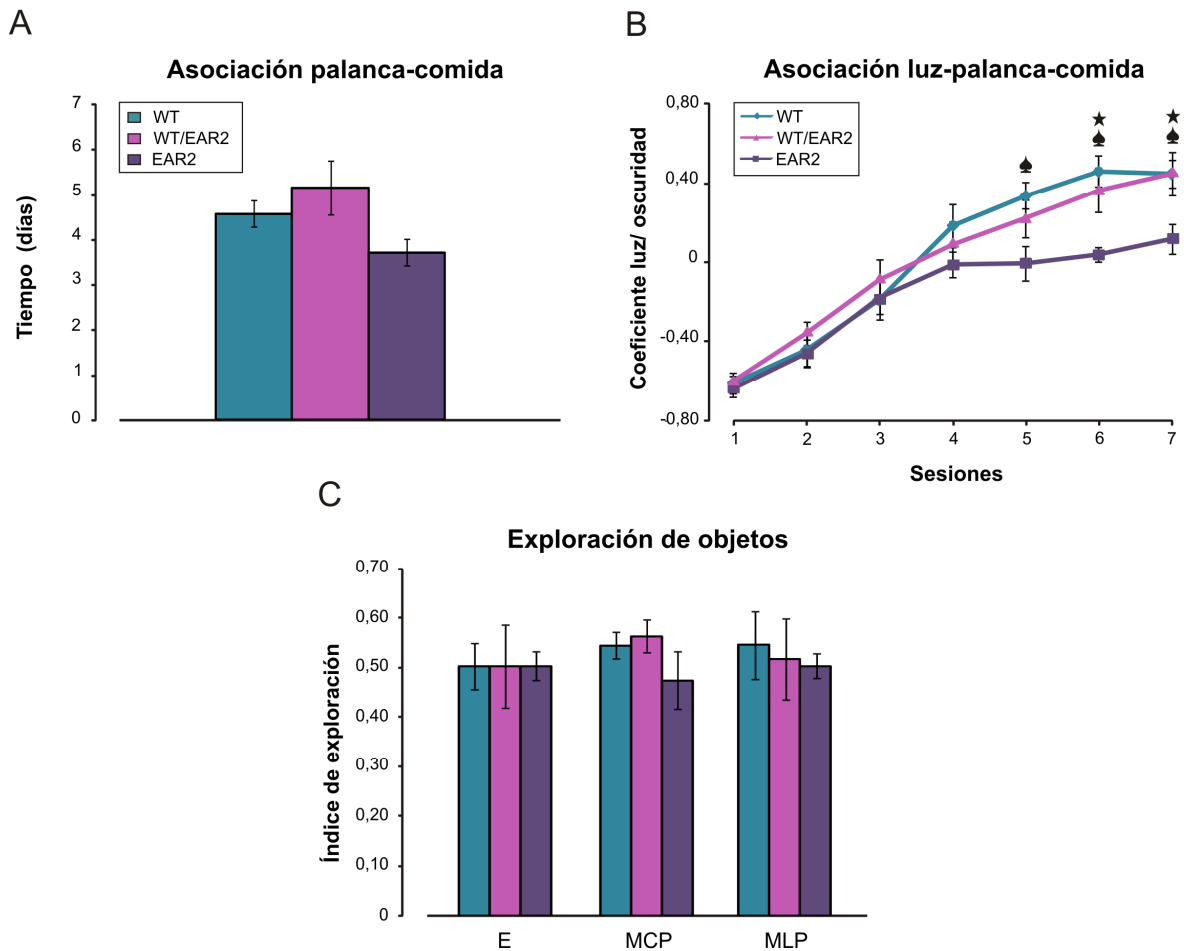
La última prueba de la serie de memoria realizada fue la de *Reconocimiento de objetos*. Además de la sesión de memoria a corto plazo (MCP) realizada en los animales neonatos, en el caso de los ratones adultos se incluyó una sesión más, la de memoria a largo plazo (MLP), realizada a las 24 horas de la sesión de entrenamiento. Al igual que en la prueba de los ratones neonatos, se estudió el índice de exploración del objeto

novedoso frente al objeto conocido para cada una de las sesiones experimentales. Un coeficiente de 0,5 significó que los animales exploraron un mismo número de veces el objeto conocido y el objeto nuevo.

Todos los grupos experimentales presentaron un índice de exploración de 0,5 en la sesión de entrenamiento. No obstante, fue en la sesión de la memoria a corto plazo y en la de largo plazo, donde existieron diferencias entre los grupos experimentales. Así, como se puede observar en la figura 4.12.C, para la memoria a corto plazo, los animales silvestres presentaron una mayor exploración del objeto novedoso frente al conocido ( $0,54 \pm 0,03$  índice de exploración). Resultados similares se obtuvieron por el grupo heterocigoto ( $0,56 \pm 0,03$  índice de exploración). Sin embargo, los animales homocigotos EAR2 mostraron un índice de exploración menor, similar al obtenido en la sesión de entrenamiento ( $0,47 \pm 0,06$ ). Pese a esto, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Para la sesión de memoria a largo plazo, los animales silvestres se mantuvieron en los mismos valores de exploración que en la sesión anterior ( $0,54 \pm 0,07$ ), contactando un mayor número de veces con el objeto nuevo que con el objeto conocido. Sin embargo, los ratones heterocigotos bajaron su coeficiente de exploración en comparación con la sesión anterior, presentando un valor de  $0,51 \pm 0,03$ . Esto significó que exploraron ambos objetos un mismo número de veces aproximadamente, como pasó en la sesión de entrenamiento. Estos resultados son similares a los obtenidos por los animales mutantes homocigotos EAR2, que se mantuvieron con los mismos valores de exploración que en la sesión de entrenamiento y en la de memoria a corto plazo ( $0,50 \pm 0,03$ ). Sin embargo, como ocurrió en la sesión de memoria a corto plazo, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

De forma general, observando los resultados obtenidos en las pruebas de memoria realizadas, los animales mutantes homocigotos EAR2 mostraron una deficiencia con respecto a los ratones silvestres para los distintos tipos de memoria analizados. Por otro lado, los sujetos heterocigotos presentaron ciertas anomalías con respecto al grupo silvestre según la prueba de memoria realizada y la sesión (corto o largo plazo) en la que nos encontrábamos.



**Figura 4.12. Aprendizaje y memoria.** (A) Histograma que muestra el número de días que necesitó cada grupo experimental para aprender la asociación palanca-comida (programa RF1) en la prueba de condicionamiento operante de la jaula de Skinner. Nótese como el grupo homocigoto (EAR2) mostró una leve tendencia a reducir el número de días necesarios para aprender la asociación palanca-comida que los animales silvestres (WT). Los ratones heterocigotos (WT/EAR2), por el contrario mostraron una tendencia a necesitar más días para aprender dicha asociación que los ratones silvestres (B) Evolución de la asociación luz-palanca-comida para cada uno de los grupos experimentales en la prueba de la jaula de Skinner. Un valor de 1 significa que el animal sólo presionó la palanca cuando había luz, recibiendo la comida y aprendiendo así la asociación. Mientras que un valor de -1 significa que el animal no aprendió la tarea. Nótese como en las últimas sesiones los animales homocigotos presentaron un índice menor y cercano a 0, que los animales silvestres y los ratones heterocigotos. Se representa con los símbolos ♠ y ★, respectivamente. (C) Número de contactos con el objeto novedoso, con respecto al total de contactos, efectuados por cada uno de los sujetos para las sesiones de la prueba de *Reconocimiento de objetos* (entrenamiento (E), memoria a corto (MCP) y a largo plazo (MLP)). Un índice de exploración de 0,5 indica que el animal exploró ambos objetos un mismo número de veces, mientras que un índice mayor de 0,5 indica que contactó más con el objeto nuevo. Nótese como en la sesión de MCP los animales homocigotos EAR2 mostraron una tendencia a explorar menos el objeto novedoso que los animales silvestres y heterocigotos. En la sesión de MLP los animales mutantes EAR2, heterocigotos y homocigotos, presentaron una tendencia a mostrar valores menores del índice de exploración que los animales silvestres.

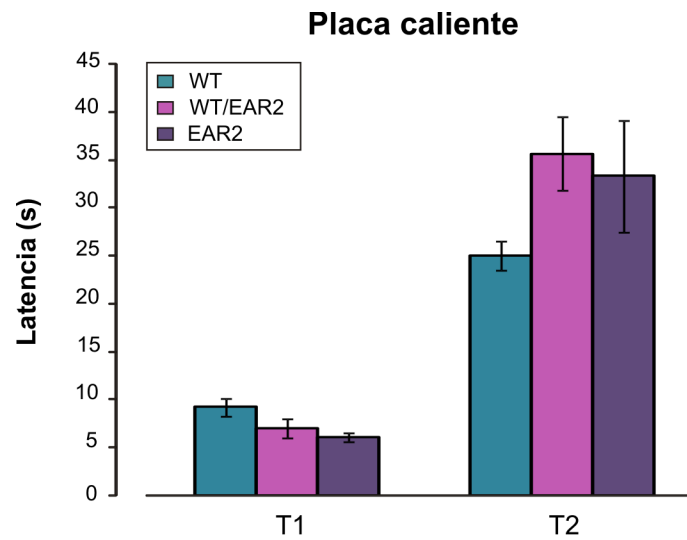
#### 4.8. INTERVENCIÓN DEL LOCUS COERULEUS EN LA ANALGESIA DEL MUTANTE EAR2 ADULTO

Para finalizar con el procedimiento experimental se realizó la prueba de la *Placa caliente*, con el fin de evaluar el efecto a largo plazo en la percepción del dolor en los animales adultos.

Al igual que en la prueba realizada para los neonatos, se estudiaron dos variables T1 y T2. La primera de ellas fue el tiempo, medido en segundos, empleado por los distintos grupos en lamerse las patas por primera vez, adoptada como medida del umbral doloroso (sensibilidad, T1). El siguiente parámetro estudiado fue la respuesta comportamental al dolor, T2, que representa la latencia, medida en segundos, que el animal empleó en intentar escapar de la placa caliente alzándose tres veces sobre las paredes de metacrilato, apoyando las dos patas delanteras o dando un salto escapando así de la placa.

Como se observa en la figura 4.13, para la variable T1, los animales silvestres mostraron una latencia mayor ( $9,21 \pm 0,99$  s) que los sujetos heterocigotos ( $6,97 \pm 0,99$  s;  $p = 0,258$ ) y los homocigotos ( $6,13 \pm 0,50$  s;  $p = 0,069$ ), que obtuvieron valores más similares, lamiéndose antes las patas que los ratones silvestres. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a la respuesta comportamental al dolor (T2), el grupo silvestre permaneció menos tiempo en la placa caliente ( $25,00 \pm 1,49$  s) en comparación con el grupo heterocigoto ( $35,60 \pm 3,81$  s;  $p = 0,264$ ) y los animales mutantes homocigotos EAR2 ( $35,60 \pm 3,81$  s;  $p = 0,523$ ), compartiendo estos dos últimos valores de latencia muy similares, que mostraron un comportamiento de escape más tardío que el grupo silvestre. Sin embargo, al igual que en el caso anterior, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 4.13. Placa caliente.** Histograma que representa la medida del tiempo empleado por cada uno de los sujetos de los distintos grupos experimentales en lamerse las patas por primera vez, mostrando la sensibilidad al dolor (T1) y en presentar una respuesta comportamental al dolor, mostrando un comportamiento de huida de la placa caliente alzándose y apoyando las patas delanteras en la pared de metacrilato o dando un salto escapando así de la placa (T2). Nótese como los animales silvestres (WT) presentaron una latencia mayor de lamerse las patas (T1) que los sujetos mutantes EAR2, heterocigotos (WT/EAR2) y homocigotos (EAR2). Sin embargo, para la variable T2, fueron los sujetos silvestres los que tardaron menos tiempo en intentar escapar de la placa caliente.



## ***5. DISCUSIÓN***



Las neuronas del Locus coeruleus son el principal aporte de noradrenalina en el sistema nervioso central. Estas neuronas noradrenérgicas están implicadas en procesos como el aprendizaje, respuesta, atención y ansiedad. En situaciones de estrés estas neuronas se activan, aumentando de este modo la liberación terminal de noradrenalina, con lo que se facilita la atención y la vigilancia. Cualquier alteración durante el desarrollo del individuo durante la etapa postnatal puede provocar efectos sobre distintos sistemas en los que el LC interviene, al producir variaciones en la concentración de noradrenalina liberada y pudiendo afectar a la sinaptogénesis y al mantenimiento de las nuevas sinapsis.

Los distintos modelos animales que hemos empleado en el presente trabajo han pretendido abordar el papel que juega el sistema noradrenérgico del tronco del encéfalo modificando, en distinto grado, su actividad. De este modo, en el ratón modelo tratado con clonidina se ha bloqueado la actividad de las neuronas del LC actuando sobre los receptores presinápticos  $\alpha_2$ . En el ratón modelo tratado con ácido retinoico hemos tenido una actividad parcial del sistema noradrenérgico. Por otro lado, en la mutación EAR2, en la cepa C57, se ha eliminado de forma selectiva una población bastante numerosa de las neuronas del LC. Quizás sea el mutante heterocigoto EAR2 el que no contaba, de partida, con una presentación de sus características estructurales y funcionales. Tras la descripción de los resultados que hemos realizado, pasaremos a discutir los aspectos más relevantes de los mismos, evaluando los efectos producidos por las distintas alteraciones realizadas en el sistema noradrenérgico.

Las consecuencias fisiológicas de la mutación que presentan los ratones EAR2 no han tenido efecto alguno en la supervivencia de éstos. Al igual que los animales tratados con ácido retinoico y con clonidina, fármacos que no afectaron de ningún modo a la supervivencia de los animales.

En una visión global de los resultados, se puede concluir que la reducción de la liberación de noradrenalina por el tratamiento postnatal con clonidina y por la reducción de neuronas del Locus coeruleus en los mutantes homocigotos EAR2 provoca serias alteraciones en los sistemas fisiológicos, que se refleja en un retraso en el desarrollo, una mayor aparición de episodios de hiperpnea y alteraciones en las pruebas de memoria entre otros. . El tratamiento con ácido retinoico, que proponíamos podría afectar la estructuración del sistema noradrenérgico durante la etapa embrionaria, parece tener

modificaciones más leves, que podrían sugerir una reducción parcial en la liberación de noradrenalina.

Cuando consideramos las pruebas realizadas de forma puntual, en animales EAR2 de mayor edad, estas alteraciones en el sistema adrenérgico se mantienen en los ratones adultos.

## **5.1. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA NORADRENÉRGICO EN LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA POSTNATAL**

### **5.1.1. La reducción de noradrenalina en el sistema noradrenérgico afecta al control de la actividad respiratoria postnatal**

Durante el desarrollo postnatal se produce una maduración funcional que afecta a numerosas estructuras del tronco del encéfalo. Entre ellas destacamos la maduración del sistema noradrenérgico, a nivel del puente, que controla al sistema respiratorio (Hilaire y cols., 2004). En este trabajo se intenta localizar las deficiencias a nivel respiratorio tras la modificación de la transmisión noradrenérgica en dos fondos genéticos distintos. Para ello, se registró la actividad respiratoria de los distintos grupos experimentales durante los siete primeros días postnatales.

Uno de los grupos de la cepa CD1 es el tratado en la etapa embrionaria con dosis subteratógenas de ácido retinoico. El ácido retinoico interviene normalmente en el desarrollo embrionario del tronco del encéfalo, el cual genera el ritmo respiratorio (y ya se había demostrado que la administración en pequeñas dosis tenía consecuencias en el ritmo respiratorio en los días P1 y P2 (Guimarães y cols., 2007; ver introducción)). Para determinar la influencia del sistema noradrenérgico en la maduración postnatal del sistema respiratorio, se aplicó a otro de los grupos de la cepa CD1, un fármaco agonista de los receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$ , la clonidina, que disminuye la liberación de noradrenalina y se sabía que controla el ritmo respiratorio neonatal (Hilaire y cols., 2004).

El grueso de los resultados muestra que no existen diferencias entre los grupos experimentales con su control cuando comparamos la cantidad de aire respirado ( $V_m$ ). Y puede que este hecho justifique la supervivencia de los individuos. Sin embargo, la amplitud de la onda y la frecuencia respiratoria de los animales tratados en ambos

grupos, es diferente a los resultados obtenidos por el grupo control. Así, mientras que los animales control aumentaron sus valores de amplitud a lo largo de los días de registro, tanto los animales tratados con ácido retinoico como los tratados postnatalmente con clonidina no presentaron esta progresión. Ambos grupos tratados presentaron una amplitud de onda respiratoria mayor que los animales control, acercándose a los valores de este grupo a medida que sucedieron los días. No obstante, los ratones tratados con clonidina seguían manteniendo estos valores superiores incluso el último día de la prueba. No debemos descartar el efecto del fármaco clonidina, el cual también se ha visto implicado en la fragmentación del ADN y muerte neuronal a nivel del tronco del encéfalo en la etapa postnatal (Dygalo y cols., 2004), pudiendo estar afectando al proceso respiratorio.

Al analizar la frecuencia respiratoria, también hubo diferencias entre los grupos tratados y el control. Así, mientras que los ratones control iban aumentando el número de ciclos por minuto a medida que pasaban los días, los animales tratados con ácido retinoico, presentaron también este incremento, pero siempre con valores inferiores a los ratones control. Por otro lado, los animales tratados con clonidina, no sólo presentaron valores inferiores de frecuencia cardiaca, si no que mantuvieron unos valores similares durante todos los días de registro. En este sentido, se corrobora la propuesta de Hilaire y cols. (2004) que proponían que los receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$ , intervienen enlenteciendo la frecuencia respiratoria. En los ratones tratados con clonidina, el posible incremento en los valores de  $V_t$  podría compensar la deficiencia de aire respirado debida a la disminución de la frecuencia respiratoria, de modo que el volumen total respirado ( $V_m$ ) aparece normal. Llama la atención que en un trabajo de Thomas y cols. (2000) los autores demuestran, en ratas, que un tratamiento postnatal con clonidina de P1 a P7 genera en P19 el efecto contrario al que hemos descrito: un  $V_m$  normal, pero con una frecuencia incrementada y un  $V_t$  reducido. Esto demuestra, en cualquier caso, que las consecuencias del tratamiento a largo plazo son duraderas, también a nivel del sistema respiratorio.

En los animales de la cepa C57BL/6, los animales mutantes heterocigotos y homocigotos EAR2 y los silvestres, también se encontraron diferencias en la actividad respiratoria. En los animales mutantes homocigotos, se observó una ligera reducción en el volumen de aire respirado en comparación con los valores obtenidos por los animales silvestres. Por otro lado, los ratones heterocigotos presentaron valores mucho mayores

de aire respirado que los animales silvestres. Se han descrito mutaciones (en los genes *Ret* y *Phox2a*) en las que desaparecen durante el desarrollo embrionario todas las neuronas del LC y en ellas se observa una clara reducción en la frecuencia respiratoria (Hilaire y cols., 2004). Estos resultados no coinciden con los obtenidos en nuestro estudio, ya que la diferencia observada en los resultados de *V<sub>m</sub>* se debe principalmente en los valores de *V<sub>t</sub>*, cuyos resultados coinciden con los obtenidos en el volumen de aire respirado; ya que no se observó ninguna diferencia entre los grupos en la frecuencia respiratoria. Así, en la frecuencia respiratoria, los dos grupos mutantes *EAR2* se comportan de la misma forma, ambos tienen una frecuencia respiratoria similar al grupo control y un *V<sub>t</sub>* disminuido en los mutantes homocigotos y aumentado en los heterocigotos *EAR2*. Esto puede llevarnos a pensar que la posible afección del Locus coeruleus (con la eliminación del 70% de las neuronas en posición dorsal) no afecta a la frecuencia pero sí a la intensidad del movimiento respiratorio, el cual se refleja en el *V<sub>t</sub>*. Esta idea podría contrastar con los resultados obtenidos en los ratones tratados con clonidina, cuyos resultados de frecuencia fueron inferiores a los del grupo control. De ello se podría deducir que el control de la frecuencia respiratoria por parte del Locus coeruleus se debe a la actividad de las neuronas ventrales de dicho núcleo (y que representan, al menos el 30 % de las neuronas totales del núcleo).

#### **5.1.2. La reducción de noradrenalina por el tratamiento postnatal con clonidina y por la mutación *EAR2* provoca un mayor número de episodios de hiperpnea**

Relacionado con el desarrollo del tronco del encéfalo, se ha descrito que la posible modificación de los patrones de expresión de los genes *Hox* durante el desarrollo embrionario, producidos por el tratamiento con dosis subteratogénicas de ácido retinoico inducen un fenotipo conductual incluyendo la respiración episódica hiperpnoeica (HEB). Este tipo de respiración se presenta como una inestabilidad respiratoria que refleja un desequilibrio del control respiratorio central por parte del puente, estructura implicada en el control de la respuesta de sobresalto, según describen Guimarães y cols. (2007). Otros estudios han demostrado que el núcleo pontino de los ratones se reduce tras la exposición a *atRA* en los días de gestación 9 y 10, mientras la oliva inferior expande su tamaño (Yamamoto y cols., 2003; 2005).

En todos los grupos experimentales descritos en este trabajo, se ha observado un aumento de la respiración episódica (HEB), menos acusada en los ratones heterocigotos EAR2 y los tratados con ácido retinoico, y evidente, sobre todo, en los animales tratados postnatalmente con clonidina.

En los registros pletismográficos, los ratones homocigotos EAR2 han mostrado una disminución leve del volumen de aire respirado por minuto ( $V_m$ ), que se corresponde con ese aumento de los HEB. Estos individuos nacen solo con un 30% de las neuronas que conforman el Locus coeruleus (Warnecke, 2004) y aunque muestran fallos en las pruebas motoras, las neuronas que presentan parece que están cumpliendo con su papel en la función respiratoria de una manera más o menos eficiente.

Este fenómeno podría ser una consecuencia del déficit de oxígeno que promueva una activación del sistema respiratorio. De hecho también se ha descrito este tipo de alteración respiratoria de Cheyne-Stokes en altura (<3500 m) cuando el centro cerebral que controla la respiración sufre una disminución en su sensibilidad, en su estado de alerta (el cual depende del LC), y deja de dirigir la respiración, o sea, de impulsar los ciclos respiratorios hasta que no se le estimule de nuevo por una concentración mucho mayor del residuo respiratorio ( $CO_2$ ) de lo que necesita habitualmente. Por esta razón, se produce un ciclo rítmico de enlentecimiento respiratorio (paro respiratorio transitorio y corto) 10-20 segundos y reanudación de la respiración con una corta aceleración que llega a ser respiración muy profunda, para volver al nuevo enlentecimiento y la nueva parada. Como hemos apuntado, en la mayoría de nuestros animales modelo, el fallo respiratorio afecta al  $V_t$ , es decir a la cantidad de aire inspirada en cada ciclo y que puede tener consecuencias en la cantidad de oxígeno disponible en sangre. El hecho de que todos nuestros modelos experimentales respondan a la deficiencia de oxígeno (hipoxia) con actividad tipo HEB, revela que ese mecanismo reflejo de defensa permanece inalterado en ellos. Como se ha mencionado, este reflejo se integra a nivel del núcleo del tracto solitario, en el que también existen neuronas noradrenérgicas (núcleo A2).

Con todo ello aún falta mucho para saber cuáles son los mecanismos que ocurren durante el desarrollo embrionario y postnatal y que determinan cuáles son las estructuras del troncoencéfalo que controlan el proceso respiratorio. Algunas mutaciones que afectan a los rombómeros r3 y r5 hacen que se elimine el grupo respiratorio parafacial que es un grupo antiapnea que promueve al complejo Pre-Bötzinger (Jacquin y cols., 1996). En

otros casos, modificando la expresión génica a nivel del rombómeros r3 se ha conseguido el efecto contrario, con ratones que respiran, al nacer, con una frecuencia respiratoria más rápida (Chatonnet y cols., 2002). El caso de los ratones tratados con ácido retinoico es el primero que sitúa los posibles daños funcionales en estructuras troncoencefálicas más rostrales, posiblemente a nivel del rombómeros r1 (Guimarães y cols., 2007). Lo que sí parece claro es que en ninguno de esos modelos se acaba afectando estructuras troncoencefálicas más caudales a nivel del bulbo raquídeo, pues los reflejos hipóxicos permanecen intactos.

## **5.2. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA NORADRENÉRGICO EN EL DESARROLLO POSTNATAL**

### **5.2.1. El sistema noradrenérgico central no participa en el desarrollo de los marcadores de desarrollo postnatal, pero sí se ve afectado por el tratamiento con ácido retinoico**

En cuanto a las pruebas relacionadas con el desarrollo fisiológico y sus marcadores, los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran como el grupo tratado postnatalmente con clonidina presentó un retraso generalizado en el desarrollo postnatal, tanto en el primer día de realización de las pruebas como en la aparición de los marcadores de desarrollo. No existen indicios que demuestren que este retraso en los marcadores se deba a un efecto en la maduración del sistema nervioso central. Se podría explicar, más bien, a un efecto del fármaco sobre los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos periféricos. De este modo, la separación tardía de las orejas y la apertura de ojos con respecto al grupo control, podría deberse a un efecto sobre el riego sanguíneo de la piel, que provocaría que el desarrollo de estas estructuras fuese más lento.

Esta hipótesis se corrobora al analizar los resultados obtenidos por el mutante EAR2, el cual también tiene una reducción de noradrenalina (a nivel central exclusivamente) debido a la eliminación de neuronas del Locus coeruleus. En el caso de la mutación EAR2, no se encontraron diferencias con el grupo control en la separación de orejas ni en la apertura de los ojos. Esto demuestra que el sistema noradrenérgico central no juega ningún papel en el desarrollo de estos marcadores externos, siendo el retraso



encontrado en el grupo tratado con clonidina consecuencia de la administración sistémica del fármaco.

En cuanto al estímulo de la oreja vemos que no está relacionado con el día en que son separadas, como podría ser el caso de los animales tratados con clonidina. Así, los ratones EAR2 separan las orejas a la vez que los silvestres, sin embargo, el reflejo de movimiento de éstas ante un estímulo táctil sufre un retraso en comparación a los silvestres. Este mismo retraso se observa al estimular los bigotes. Con ello, la ausencia del 70% de las neuronas del LC en posición dorsolateral sí está afectando, de alguna forma, a la integración de la respuesta motora que se produce tras la presentación del estímulo.

Los animales tratados con ácido retinoico también presentaron diferencias con respecto al grupo control en los marcadores de desarrollo. Así, en lo referente a la separación de orejas, adelantada en los ratones retinoico, y la apertura de ojos, retrasada en dichos animales, nos lleva a pensar que el sistema adrenérgico se ve afectado funcionalmente por el tratamiento con retinoico durante la organización embrionaria del tronco del encéfalo y, lo que resulta novedoso, que este sistema pueda estar participando en el desarrollo o maduración de estos sistemas sensoriales (en lo que a su manifestación externa se refiere).

En lo referente al estudio del sistema auditivo, con la prueba de la estimulación sonora (respuesta de sobresalto) detectamos que las camadas tratadas con ácido retinoico presentaron un retraso en la aparición de la repuesta de sobresalto con respecto a los silvestres, si bien no existe retraso en la separación de orejas, como ocurría con los animales tratados con clonidina. Así, nuestro estudio demuestra que la interferencia con el sistema noradrenérgico durante el desarrollo postnatal afecta a la respuesta de sobresalto, como se ha descrito con anterioridad (Shishkina, y cols., 2001; Shishkina y cols., 2002; Shishkina y cols., 2004).

La posible modificación de los patrones de expresión de los genes Hox durante el desarrollo embrionario, producidos por el tratamiento con dosis subteratogénicas de ácido retinoico inducen un fenotipo conductual incluyendo la respiración episódica hiperpnoeica (HEB), una inestabilidad respiratoria que refleja un desequilibrio del control respiratorio central por parte del puente, estructura implicada también en el control de la respuesta de sobresalto, según describen Guimarães y cols. (2007).

### **5.2.2. Las distintas modificaciones realizadas en el sistema noradrenérgico afectan al desarrollo del reflejo de succión**

El reflejo de succión ocurre tras una estimulación sensitiva de la zona perioral, la cual está inervada principalmente por el nervio craneal trigémino. Una de las proyecciones eferentes descendentes del Locus coeruleus llega a la zona del núcleo trigémino. Debido a esto es lógico observar que el grupo tratado con ácido retinoico y el tratado con clonidina, donde se ha inhibido la actividad de las neuronas del LC, acabe afectando a este reflejo. Mientras el grupo control mostró una tendencia a aumentar el número de masticaciones conforme iban pasando los días, los animales tratados mantuvieron aproximadamente el mismo número de masticaciones durante los días de la prueba.

Al igual que sucedió con los animales tratados con clonidina y ácido retinoico, los ratones EAR2 también presentaron anomalías en el reflejo de succión. Estos animales tienen reducido el número de neuronas del Locus coeruleus, por lo que la proyección al trigémino, mencionada anteriormente, también se tenía que ver afectada. Los ratones EAR2 mutantes (homocigotos y heterocigotos) y los ratones silvestres, iban aumentando el número de masticaciones a lo largo de los días de la prueba; sin embargo, los mutantes homocigotos y heterocigotos mostraron un ascenso en el número de masticaciones mucho más alto que los ratones silvestres. Aún implicando la participación de los núcleos trigeminales, el movimiento rítmico de la masticación se ve afectado por las modificaciones que tienen lugar en el puente como ya se refirió en algunos casos en los que el sistema noradrenérgico pontino se veía afectado en neonatos (Jacquin y col., 1996). No obstante en dicho estudio sólo se analizaban los primeros días de vida (los ratones morían a las 24-48 horas de vida). En nuestro estudio, con datos similares los primeros días postnatales, no se descarta que los ratones silvestres rechacen el catéter al no obtener alimento de él.

### **5.2.3. La disminución de la transmisión noradrenérgica por la administración postnatal de clonidina y la eliminación de neuronas del Locus coeruleus en el mutante EAR2 produce un retraso en el desarrollo del sistema vestibular**

Para determinar si los tratamientos realizados ocasionaban afecciones en el sistema vestibular, se realizaron pruebas tales como el reflejo de giro, el vértigo y la rampa inclinada (geotaxia negativa).

De modo general, en las tres pruebas relacionadas con el sistema vestibular, los grupos experimentales presentaron una disminución en los tiempos de ejecución de la prueba a medida que sucedían los días.

Sin embargo, el grupo tratado postnatalmente con clonidina, donde se interfirió en la liberación de noradrenalina, mostró un retraso en la realización de las distintas pruebas, tardando un día más en la ejecución de las mismas. La clonidina inhibe la excitabilidad de las neuronas del Locus coeruleus, obteniendo como consecuencia la disminución en la liberación de noradrenalina. Esta reducción de noradrenalina se manifiesta en un retraso en la aparición y en la ejecución de las distintas pruebas vestibulares. El uso de clonidina se ha asociado a una fragmentación del ADN y a una pérdida de neuronas en la parte más rostral del troncoencéfalo (Dygallo y cols, 2004), afectando esto a las regiones implicadas, interfiriendo en el desarrollo de los centros que regulan el sistema del equilibrio, localizados en el tronco del encéfalo, o haciendo que el sistema funcione de manera más lenta, ya que los sujetos tratados con clonidina finalmente sí realizan las pruebas, pero éstas se ven retrasadas en el tiempo. Existen antecedentes en los que la manipulación neonatal de los receptores  $\alpha_2$  en la zona del puente ha demostrado tener consecuencias en el adulto, que afectaban a funciones reflejas como la respuesta de sobresalto y la inhibición por prepulso (Shishkina, y cols., 2001; Shishkina y cols., 2002; Shishkina y cols., 2004). Estos estudios avalan que la interferencia con la neurotransmisión noradrenérgica hacia regiones corticales, en su caso potenciándola afectan a dichas funciones, y podría justificar que nuestro tratamiento, que hace lo contrario, pueda interferir también con las mismas. Otros estudios realizados en ratones adultos han demostrado que el sistema noradrenérgico todavía participa en el reflejo de giro a esas edades (Gilsbach y cols., 2009).

Los ratones mutantes EAR2, al igual que los ratones tratados con clonidina, presentaron un mayor tiempo en la ejecución de las pruebas vestibulares que su grupo control. Al igual que ocurría con los ratones tratados con clonidina, al reducir el número de neuronas del Locus coeruleus con la mutación EAR2, la secreción de noradrenalina es mucho menor. Por lo tanto, cabe pensar que la deficiencia en el sistema vestibular (y de equilibrio) observada, se deba a la parte del LC eliminada en dichos ratones, lo que nos hace proponer que la parte dorsolateral del Locus coeruleus es la que participa en la maduración del sistema vestibular.

El caso del mutante heterocigoto EAR2 es algo más difícil de explicar. Ya que los primeros días de realización de las pruebas este mutante presentó datos similares a los del grupo control. Mientras, en los días intermedios de las pruebas, éstos se comportaron como los animales mutantes homocigotos, mostrando latencias más altas. Volviendo a mostrar, los últimos días de realización de las pruebas, latencias de ejecución similares a las de los animales control para las pruebas de vértigo y reflejo de giro, mientras que para la prueba de la geotaxia negativa presentó valores similares a los del mutante homocigoto. Estos resultados se podrían explicar por la reducción de neuronas del Locus coeruleus (pero en menor medida que para el mutante homocigoto) o por una deficiencia funcional de las mismas. Debido a esto, existiría una reducción de noradrenalina que interfiera en el desarrollo del sistema vestibular, afectando a unas vías más que a otras y dependiendo del día postnatal en el que nos encontremos. El que el mutante heterocigoto se haya considerado normal hasta la fecha y la falta de evidencias morfológicas, sólo nos permiten realizar conjeturas a este respecto.

Atendiendo a los ratones tratados con ácido retinoico, éstos mostraron una mayor rapidez en la realización de las pruebas vestibulares que los ratones control. No obstante, la latencia de ejecución de las pruebas a medida que iban pasando los días experimentales, no fue tan progresiva como ocurrió con el grupo control. Es decir, los ratones retinoicos realizaban antes las pruebas vestibulares que los controles, pero, siempre se mantenían sobre los mismos valores de latencia de ejecución.

La posición del cuerpo está controlada por el oído interno y por las aferencias del nervio vestibulococlear (VIII) y las proyecciones de éste hasta los rombómeros r4 y r5. Si se encuentran modificaciones en estas estructuras se producirán fallos en el reflejo de giro (Erickson y cols., 1996). También se han descrito modificaciones en el oído interno si

se alteran los rombómeros r5 y r6, en los que el tiempo de reflejo también se ha visto afectado (Hertwig, 1944; Deol, 1964; Fekete, 1999; Chatonnet y cols., 2002).

Se podría concluir, que el tratamiento embrionario con ácido retinoico, a las dosis subteratógenas empleadas, afecta al desarrollo del sistema vestibular de los neonatos. Como se mencionó en la introducción, el ácido retinoico está implicado en el desarrollo del troncoencéfalo y en el sistema vestibular, por lo que la hipótesis podría ser que estos individuos desarrollan antes estas estructuras aunque muestren deficiencias en otras pruebas. Estos resultados coinciden con otros trabajos publicados anteriormente por Guimarães y cols. (2007) para este modelo animal.

#### **5.2.4. La reducción de la transmisión noradrenérgica debido a la administración de clonidina y a la eliminación de neuronas del Locus coeruleus aumenta la latencia de suspensión de los ratones neonatos**

En el presente trabajo se ha demostrado como aquellos ratones que tenían una reducción debido al tratamiento postnatal con clonidina y a la mutación homocigota EAR2, presentaron una latencia de permanencia mayor en la prueba de suspensión. No obstante, este aumento de la latencia, frente al grupo tratado con ácido retinoico y a los controles, no pareció ser una razón de fuerza, sino más bien una cuestión de actitud.

A partir de nuestra observación, hallamos que los ratones tratados con ácido retinoico y los sujetos control, conforme pasaban los días, se mostraron más inquietos y en ocasiones rehusaban a realizar la prueba. Sin embargo, tanto los ratones tratados con clonidina como los mutantes homocigotos EAR2, permanecían más tranquilos, suspendidos en la cuerda sin apenas mostrar ningún signo de exploración. Hay que añadir, para el caso de los ratones tratados con clonidina, que ésta suele usarse como sedante (Maze y cols, 2001), haciendo que estos ratones permanecieran más tranquilos en unas edades en que su movilidad debía ser muy acentuada. Así los grupos control y el tratado con ácido retinoico son más exploradores, moviéndose más, girando, obteniendo latencias menores en la prueba.

Se concluye, por tanto, que en nuestro caso, el test puede que no sirva para cuantificar la fuerza de los animales, pudiendo medir otras actitudes relacionadas con el

interés, la actividad exploratoria o la ansiedad. Estas actitudes se analizarán con más detalle en los siguientes apartados.

### **5.3. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA NORADRENÉRGICO EN LA ACTIVIDAD EXPLORATORIA**

#### **5.3.1. Las distintas alteraciones producidas en el sistema noradrenérgico afectan a la actividad exploratoria de los ratones neonatos**

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que todos los grupos experimentales fueron incrementando su actividad acumulada en la prueba del actímetro. No obstante, este incremento varió según el grupo. Así, los animales tratados con ácido retinoico mostraron un mayor grado de actividad motora comparado con el grupo control. Estudios llevados a cabo por Holson y cols. (1997), muestran efectos en el peso del cuerpo y del cerebelo frente a la exposición de 2,5 mg / kg de ácido retinoico en ratas hembras embarazadas durante la etapa gestacional (E11-E13, etapa posterior a E7,5 en ratón, donde se realizó nuestro tratamiento). Se concluye que dosis suficientemente bajas para producir reducciones de peso del cerebelo, sin atender a malformaciones, pueden alterar el comportamiento. Estos efectos se observaron sólo en un subconjunto de pruebas, como en la rueda de carreras, que fue mejorada por la exposición a ácido retinoico, especialmente durante las horas del día de máxima actividad del personal de cuidado de los animales. Con nuestro tratamiento no se han observado modificaciones significativas en el tamaño del cerebelo, pero sí en el desplazamiento del pedúnculo cerebeloso, en la parte dorsal del puente (Guimarães y cols., 2007). Además de la aplicación de ácido retinoico en una etapa posterior a la empleada en nuestro tratamiento, a día de hoy, este exceso de actividad se postula que puede ser debido a una posible deficiencia de dopamina en la región cortical pre-frontal (Wilens y Spencer, 2000) y no por la reducción de noradrenalina, por lo que nuestro modelo RA puede que tenga también afectadas las vías dopaminérgicas. De hecho, distintos experimentos preliminares realizados por nuestro grupo, han demostrado que al tratar con metilfenidato, un fármaco que inhibe la recaptación de dopamina y noradrenalina, a los ratones tratados embrionariamente con ácido retinoico, reducen su actividad en la prueba del campo abierto.

Por otro lado, los animales tratados con clonidina mostraron una hipoactividad con respecto al grupo control. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Mirmiran y col. (1985) que referían un cuadro de hiperansiedad e hiperactividad tras el tratamiento postnatal con clonidina. Es posible que la prueba del actímetro no sea suficiente para separar ambas conductas. En cualquier caso, nuestros ratones sí demostraron ser hipoactivos, dato que a su vez, sería lógico obtener ya que la clonidina es usada como sedante (Ansermino y col., 2003). Este dato concuerda con los resultados obtenidos en la prueba de suspensión incluida en la batería de Fox, en la que al tener una menor actividad exploratoria, los ratones tratados con clonidina permanecieron más tiempo suspendidos en la cuerda.

Para el caso de los ratones con la mutación EAR2, apenas existieron diferencias entre los mutantes (homocigotos y heterocigotos) y sus controles, tanto como para la prueba realizada en neonatos como en adultos. No obstante, ambos grupos mutantes mostraron tendencias distintas en la prueba realizada en neonatos y en adultos. Así, para los ratones neonatos, los mutantes heterocigotos mostraron un menor grado de actividad, mientras que los homocigotos EAR2 presentaron una tendencia a explorar más. Estos resultados se invirtieron para los animales adultos. Esta diferencia, se puede deber a la no distinción de sexos en las pruebas realizadas en neonatos, lo cual puede alterar el resultado, siendo las hembras menos activas que los machos. Además de una clara diferencia entre el sistema noradrenérgico y el desarrollo de sus distintas conexiones en el ratón neonato y el adulto.

Además de la actividad acumulada, otra de las variables estudiadas en la prueba de campo abierto fue la actividad mostrada en el centro del actímetro. Esta variable se utilizó como medida de la ansiedad en los ratones. Aunque no existieron diferencias estadísticamente significativas, sí existió una tendencia por parte de los ratones tratados con ácido retinoico a permanecer menos tiempo en el centro del actímetro, mostrando una mayor ansiedad. Como ya hemos dicho anteriormente, los estudios de Mirmiran (1985) exponen casos de hiperansiedad en adultos tras el tratamiento crónico con clonidina. Estos resultados se contraponen a los obtenidos en nuestro estudio, en los que los animales tratados postnatalmente con clonidina presentaron una latencia de permanencia en el centro similar a la obtenida por el grupo control. Se podría considerar que nuestros ratones realizaban la prueba bajo el efecto del fármaco, mientras los estudios en ratas analizan el efecto del tratamiento a largo plazo. Sin embargo, puede ser

que ésta prueba no sea suficiente para medir la ansiedad del animal, siendo acertado completarlo con otro tipo de pruebas de estrés y ansiedad.

En los animales adultos con la mutación EAR2 (homocigotos y heterocigotos), se encontró una tendencia a permanecer más tiempo en el centro del actímetro que los animales control. Estos resultados estarían acorde con los obtenidos por Samuels y Szabadi (2008), en los que se reducía la ansiedad de los animales tras la inactivación del Locus coeruleus. Sin embargo, en los ratones neonatos, aunque la latencia de permanencia en el centro de los ratones heterocigotos es superior que la de los control, no ocurre lo mismo para los mutantes homocigotos, que permanecieron un menor tiempo en el centro del actímetro. Se repite por lo tanto una diferencia entre la función del sistema adrenérgico de los ratones neonatos y de los adultos.

### **5.3.2. La mutación EAR2 perjudica el aprendizaje motor y la coordinación del ratón adulto**

Los resultados presentados en nuestro estudio revelan claramente que la mutación EAR2 perjudica la coordinación y el aprendizaje motor del ratón adulto. Así, en la prueba del Rotarod los animales mutantes homocigotos presentaron una latencia de la primera caída menor que los animales control, los cuales no se cayeron en ninguna de las sesiones de la prueba. El ratón mutante homocigoto EAR2 fue capaz de mejorar sus resultados a lo largo de las sesiones de la prueba, mostrando así una capacidad de aprendizaje, sin embargo, sus valores se mantuvieron siempre por debajo de los del ratón silvestre. Los ratones heterocigotos, por otro lado, alcanzaron una latencia de la primera caída similar a la de los animales control, pero si atendemos al número total de caídas, éstos se igualaron a los mutantes homocigotos, cayendo ambos un mayor número de veces que los animales control. Este apartado se podría incluir en el apartado de aprendizaje y memoria además de en la exploración, ya que una vez que repetimos las pruebas motoras comportamentales, destinadas a determinar o cuantificar una conducta, se pueden considerar como pruebas de aprendizaje motor, y esta prueba de Rotarod es un ejemplo de ello. Así, a medida que se sucedieron las sesiones, los ratones redujeron la latencia a la primera caída y el número total de éstas. Sin embargo, los mutantes obtuvieron valores inferiores a los de los animales silvestres. Esto concuerda con distintos estudios relacionados con la memoria, en el que consideran que la



noradrenalina es esencial en procesos de atención y como consecuencia para la memoria. En el siguiente apartado se explicará con mayor detalle esta relación entre memoria y aprendizaje y noradrenalina.

#### **5.4. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA NORADRENÉRGICO EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA**

##### **5.4.1. Las distintas alteraciones provocadas en el sistema noradrenérgico provocan una reducción en la exploración de los objetos novedosos**

El hipocampo es una de las estructuras relacionadas con la memoria más estudiada a día de hoy. Distintos estudios señalan al Locus coeruleus como la única fuente de noradrenalina a las neuronas del hipocampo (Fu y cols., 1999; Kiernan, 2005; Lindvall y Stenevi, 1978; Loughlin, 1986; Nieuwenhuys, 1985; Pasquier y Reinoso-Suarez, 1978; Ungerstedt, 1971). El hipocampo es una estructura límbica centrada principalmente en la formación de la memoria declarativa, por lo que las distintas proyecciones entre el Locus coeruleus y el hipocampo pueden contribuir a la formación de la memoria. En experimentos realizados por Sullivan y cols. (1994) mostraban como ratas recién nacidas con lesiones en el Locus coeruleus presentaban una deficiencia en el aprendizaje olfativo.

De la misma manera, otro estudio realizado por el grupo de José María Delgado, mostró que durante el reconocimiento de objetos también se producía potenciación de la sinapsis CA3 – CA1 del hipocampo (Clarke y cols., 2010). Así, en nuestro estudio quisimos ver la relación de las distintas alteraciones en el sistema noradrenérgico y su relación con el hipocampo y la memoria declarativa a partir de la prueba del reconocimiento de objetos.

En los resultados obtenidos en nuestro estudio, se puede observar que en todos los grupos en los que se vio afectado el sistema noradrenérgico de distintas formas, presentaron una menor exploración del objeto novedoso que el grupo control, mostrando así una deficiencia en la memoria y el aprendizaje. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas, por lo que sólo podríamos hablar de tendencias.

Los animales con un tratamiento embrionario de ácido retinoico presentaron una exploración del objeto novedoso igual a la mostrada en la sesión de entrenamiento. Esto significaría que en ambas sesiones exploró ambos objetos por igual, sin identificar, por lo tanto, la presencia de un objeto nuevo. Estos resultados se diferenciaron de los obtenidos para los sujetos control, que mostraron, lógicamente, una mayor exploración por el objeto novedoso en la sesión de memoria a corto plazo, y por lo tanto, identificando el nuevo objeto colocado en la caja. Estos datos se repitieron en aquellos animales neonatos con una reducción de noradrenalina, ya fuese por el tratamiento postnatal con clonidina o debido a la mutación EAR2. En todos estos grupos, los animales presentaron una deficiencia en el aprendizaje, ya que fueron incapaces de reconocer el objeto novedoso frente al conocido en la memoria a corto plazo. Por el contrario, los animales control presentaron una tendencia a explorar un mayor número de veces el objeto novedoso, identificándolo así como un objeto desconocido que debían explorar.

Sin embargo, los ratones adultos con la mutación heterocigota EAR2 mostraron diferencias con respecto a los neonatos mutantes. Así, mientras que los mutantes adultos homocigotos repetían los valores de exploración obtenidos por los neonatos, es decir, exploraban menos el objeto novedoso en comparación con el grupo control, los ratones heterocigotos se comportaban como los animales control. Incluso, mostraban una tendencia a explorar el objeto novedoso un mayor número de veces que los animales control en la sesión de memoria a corto plazo. No obstante, quisimos ir un poco más allá y estudiar qué ocurría con la memoria a largo plazo, si ésta también se veía afectada por la reducción de noradrenalina. En este caso, tanto los mutantes homocigotos como los heterocigotos mostraron una menor exploración del objeto novedoso que el grupo control. Por lo que parece que en la memoria a corto plazo de los animales adultos, debe haber algún tipo de compensación ante la falta de noradrenalina. O quizás, esto también podría explicarse como que la noradrenalina existente en los animales heterocigotos, aunque escasa, fuese suficiente para este tipo de pruebas de reconocimiento a corto plazo, siendo insuficiente para tareas más complicadas que impliquen memoria (esto es, retención) a largo plazo.

Funcionalmente, se han descrito modificaciones en estructuras corticales (hipocampo) que pueden afectar a la capacidad de retención, cuando se interfiere durante el desarrollo postnatal en la neurotransmisión noradrenérgica, con un tratamiento crónico con clonidina (Gorter y col., 1989; Jentsch y Anzivino, 2004) o con la exposición a

ácido retinoico en los días de gestación (E8-E10 en ratas) (Holson y cols., 1997), por ejemplo, produciendo daños en el aprendizaje. A modo general, podríamos decir que nuestros resultados concuerdan con los distintos estudios mencionados anteriormente, en los que las distintas proyecciones entre el hipocampo y el Locus coeruleus, como principal aporte de noradrenalina, son necesarios para el establecimiento y la recuperación de la memoria.

#### **5.4.2. La mutación EAR2 impide el aprendizaje con un estímulo aversivo en ratones adultos**

La amígdala es la principal responsable de las respuestas de miedo y ansiedad antes estímulos ambientales amenazadores. Al igual que ocurría con el hipocampo, el Locus coeruleus tiene un gran número de proyecciones con la amígdala, en particular a los núcleos basal y central.

La activación del LC por la estimulación eléctrica o por la administración de distintos fármacos, como la yohimbina (antagonista de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ ) provoca un aumento en la ansiedad. Además de en la ansiedad, las distintas proyecciones del LC a la amígdala también juegan un papel importante en la formación y recuperación de memorias emocionales (Samuels and E. Szabadi, 2008). De acuerdo con estos resultados, diversos estudios llevados a cabo por Roozendaal y cols. (2008), proponen que la noradrenalina liberada en la amígdala basolateral favorece la memoria.

Los resultados obtenidos tras nuestro estudio están acorde con los trabajos anteriormente mencionados. Ya que los animales mutantes EAR2, los cuales tienen una reducción en la secreción de noradrenalina, tienen dificultades en la realización de la prueba de la evitación pasiva, que está relacionada directamente con la estructura de la amígdala. Los animales silvestres, al recibir la descarga tras la primera entrada en la cámara oscura, no volvieron a entrar en ninguna de las sesiones posteriores. Sin embargo, los grupos mutantes heterocigoto y homocigoto, siguieron entrando en las sesiones para evaluar la memoria a corto y largo plazo.

El grupo mutante homocigoto no mejoró sus resultados de latencia de entrada en las dos últimas sesiones. Sin embargo, los ratones heterocigotos tardaron más en entrar

en el compartimento a medida que sucedieron las sesiones de la prueba. No obstante, no llegaron a alcanzar los resultados obtenidos por el grupo control.

Así, en estos animales, la cantidad de noradrenalina parece proporcional a la memoria emocional, representada por la amígdala. La liberación de noradrenalina por factores de atención, parece ser esencial para el aprendizaje y es responsable de la consolidación de la memoria (Gibbs, 2000).

#### **5.4.3. Respuestas reflejas auditivas en el mutante EAR2 adulto**

En distintos experimentos realizados por Adams y Geyer (1981) se observó que una lesión bilateral en el Locus coeruleus en ratas, reducía la magnitud de la reacción de respuesta a un estímulo con aire. Estos estudios fueron ampliados posteriormente por Tsuruoka y cols. (2010), en los que, además de confirmar que el Locus coeruleus y Locus subcoeruleus ejercían una influencia excitatoria en la respuesta de sobresalto a un estímulo de aire, analizaron el periodo DIP. Este periodo DIP es una postura inmóvil, de defensa, de una latencia de 2 a 5 segundos, que acompaña a la respuesta de sobresalto, pero es independiente. Este periodo también disminuyó en las ratas con un daño en el LC y SC. Si se activaban estas estructuras durante el DIP, se producía una influencia inhibitoria en mecanismos sensoriales en el cerebro y la médula espinal. Es decir, el animal se concentraba en las circunstancias, inhibiendo información sensorial innecesaria, para extraer otra información sensorial necesaria para la supervivencia.

Asimismo, otros estudios (Shishkina y cols., 2003, 2004) demostraron que la interferencia con la expresión postnatal de los receptores  $\alpha_2$  en el tronco del encéfalo, disminuía la intensidad de la respuesta de sobresalto en ratas adultas. En nuestro caso, el ratón mutante homocigoto EAR2 presentó una menor intensidad de la respuesta de sobresalto en la línea base (VMP), comparado con el ratón control. Esta reducción en la intensidad no afectó la latencia de la respuesta. Confirmando así los resultados obtenidos por los estudios anteriores, en los que se concluye que el Locus coeruleus modula el comportamiento de sensibilidad a entradas sensoriales, participando así en la respuesta de sobresalto.

De ello se deduce que la maduración postnatal de la señalización noradrenérgica, y con ella la actividad de las neuronas del LC, participa en la respuesta de sobresalto.

En la inhibición por prepulso, el mutante homocigoto presentó una inhibición mayor en la intensidad (VMP), a penas afectando la latencia al pico máximo y no alterando la latencia de respuesta. Estos resultados coindicen con distintos estudios realizados por Hoffman e Ison (1980) y Takeuchi y cols. (2001), que sugieren que las alteraciones en la inhibición por prepulso podrían deberse a déficits en la integración motosensorial a nivel del tronco cerebral o de su modulación por parte del cerebelo (López-Ramos y cols., 2010; Porras-García y cols., 2005).

#### **5.4.4. La reducción de neuronas del Locus coeruleus en el mutante EAR2 dificulta el aprendizaje instrumental en el ratón adulto**

Como ya se ha mencionado anteriormente, el hipocampo es la estructura cerebral más estudiada por su participación en los procesos de aprendizaje y memoria. Numerosos trabajos relacionan el aprendizaje asociativo con esta estructura (Gruart. y cols., 2006; Madroñal y cols., 2007). Por otro lado, en estudios realizados para comprobar el papel del hipocampo en el condicionamiento operante (Corbit y Balleine 2000), se demostró que los animales podían adquirir la tarea instrumental aún sin el hipocampo. No obstante, se piensa que los animales con lesiones en el hipocampo tienen dificultades para realizar asociaciones entre el contexto estimular y una consecuencia (Jarrard, 1995; Corbit y Balleine, 2000; Cheung y Cadinal, 2005). Estudios recientes (Jurado-Parras, 2012), proponen que el hipocampo no es imprescindible para la adquisición de ciertos aprendizaje asociativos, como es el condicionamiento instrumental; al menos, no de la misma manera que para la adquisición del condicionamiento clásico. Estos estudios proponen la implicación de otras vías durante el condicionamiento operante, como la vía tálamo – corteza prefrontal medial (Herry y cols., 1999), amígdala – corteza prefrontal medial (Maroun y Richter-Levin, 2003) y/o la vía corteza somatosensorial – corteza prefrontal medial (Gemmell y O'Mara, 2000), además de cierta implicación del hipocampo, ya que como se ha comentado anteriormente, aquellos animales con una lesión en el hipocampo presentaron dificultades en la ejecución de la tarea operante.

Debido a la complejidad de la gran variedad de vías que participan en el condicionamiento operante, quisimos ver cómo afectaba la reducción de neuronas del Locus coeruleus en el mutante EAR2 en la ejecución de la tarea instrumental. Ya que

como hemos reiterado, las neuronas noradrenérgicas están implicadas en procesos de aprendizaje, respuesta y atención.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran una tendencia de los mutantes homocigotos EAR2 en presentar una deficiencia en la adquisición de la asociación presión de la palanca-comida, tardando un día y medio más que los ratones silvestres y los mutantes heterocigotos en aprender la asociación.

Una vez que todos los grupos adquirieron la asociación palanca-comida, se aumentó la dificultad con una tarea asociativa con un estímulo discriminativo. Este tipo de condicionamiento con estímulo discriminativo, se eligió porque se ha visto que el hipocampo está relacionado con el aprendizaje de la asociación contexto-refuerzo (Corbit y Balleine, 2000). En el condicionamiento instrumental con el estímulo discriminativo elegido, el animal debía realizar una asociación entre el estímulo luminoso y la obtención de la recompensa. Al igual que en el caso anterior, los animales homocigotos EAR2 mostraron una deficiencia en la adquisición de la asociación luz-comida, obteniendo un índice en torno al valor cero, lo que significa que presionaron la palanca de forma indiferente en la presencia de luz u oscuridad. Nuestros resultados, por lo tanto, coinciden en parte con los estudios mencionados anteriormente, ya que al limitar la proyección noradrenérgica, el hipocampo se ve afectado, presentando así dificultades para realizar asociaciones entre el contexto estimular y una consecuencia (Jarrard, 1995; Corbit y Balleine, 2000; Cheung y Cadinal, 2005). Estos datos a su vez, concuerdan con los resultados obtenidos para la prueba del reconocimiento de objetos, donde los mutantes EAR2 adultos mostraron una deficiencia en la identificación del objeto novedoso. Sin embargo, para el caso de los animales mutantes heterocigotos no concuerda, ya que para el condicionamiento operante el ratón heterocigoto EAR2 mostró valores similares al silvestre. Por lo que podríamos decir que además del hipocampo, para el condicionamiento instrumental, están implicadas otras vías independientes de la noradrenalina, las cuales no se ven afectadas en el mutante EAR2, pero sí son complementarias a las vías noradrenérgicas, pareciendo afectar al mutante homocigoto, pero no siendo suficiente para impedir el aprendizaje instrumental en el mutante heterocigoto EAR2.

### 5.5. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA NORADRENÉRGICO EN LA ANALGESIA

En distintos experimentos realizados en ratas, se ha demostrado que las neuronas del Locus coeruleus son activadas por la estimulación directa de fibras C sensitivas de los nervios periféricos. Éstas transportan aferencias relacionadas con estímulos dolorosos, temperatura y mecanorrecepción de bajo umbral y tendrían así la función de incrementar el estado de alerta y la atención.

El LC podría también formar parte del mecanismo central de control del dolor. En ratas, la analgesia, considerada como un mayor tiempo de latencia entre el estímulo doloroso y un movimiento reflejo, es producida por estimulación química o eléctrica del LC. La analgesia así obtenida es bloqueada por la administración intratecal a nivel del tronco del encéfalo de antagonistas  $\alpha_2$  adrenérgicos (phentolamin, yohimbina), indicando que la analgesia inducida por el LC estaría mediada por un sistema noradrenérgico descendente.

Por otro lado, en estudios realizados para comprobar el papel de la noradrenalina en la nocicepción (Willis y cols., 2004), se demostró que ésta actúa como antinociceptivo. Así, en trabajos posteriores realizados por Warnecke y cols., 2005, se observó que los ratones homocigotos EAR2, que tenían un menor número de neuronas en el Locus coeruleus, tenían la tendencia de lamerse las patas antes que los sujetos silvestres, en la prueba de la placa caliente, mostrando así una sensibilidad mayor.

En nuestro estudio, los ratones adultos con la mutación EAR2 (heterocigotos y homocigotos) mostraron una menor latencia en lamerse las patas en la prueba de la placa caliente que los ratones silvestres, coincidiendo con los estudios anteriormente mencionados. Así, la reducción de neuronas en el Locus coeruleus, producida por la mutación EAR2, disminuye la secreción de noradrenalina, la cual, como hemos dicho anteriormente funciona como antinociceptivo. Como consecuencia, se aumentó la sensibilidad de los ratones mutantes.

Llama la atención que para los ratones neonatos, los resultados difieren con los obtenidos en los adultos. Así, los ratones con una reducción de la secreción de noradrenalina debido al tratamiento con clonidina, presentaron una sensibilidad igual que los ratones control, por lo que la reducción de noradrenalina por el fármaco no disminuyó, en este caso, la sensibilidad de los animales. Debido al uso como anestésico de la

clonidina, (se usa incluso como anestésico local en niños (Ansermino y col., 2003)) sería lógico observar el efecto analgésico (sobre la latencia T1) que tiene el grupo tratado con clonidina sobre el control. Sin embargo, esto no ocurre así, obteniendo ambos la misma latencia.

Para la disminución de noradrenalina debido a la mutación homocigota EAR2, el umbral doloroso (T1) es mayor que para los ratones silvestres, lamiéndose las patas en un tiempo superior a éstos. Estos resultados se contraponen con los obtenidos para los mutantes EAR2 adultos y los distintos estudios anteriormente mencionados (Willis y cols., 2004; Warnecke y cols., 2005). Estos resultados se repitieron para los animales tratados con ácido retinoico, que presentaron una latencia al lamerse las patas delanteras, mayor que los animales control, mostrando así ambos grupos algún tipo de analgesia o hiperalgesia con respecto al grupo control.

En referencia a la respuesta de huida (T2), como respuesta comportamental al dolor, los animales tratados con clonidina y los tratados con ácido retinoico permanecieron menos tiempo sobre la placa caliente que sus controles. En este caso resulta más difícil encontrar una explicación, se podría argumentar que la situación de dolor cree ansiedad en los animales, menor en los tratados que en los control, y no tendría que ir en contraposición a los estudios obtenidos por Mirmiran y col. (1985), ya que ellos hacen referencia a casos de hiperansiedad tras el tratamiento crónico con clonidina, pero en adultos. Así, los ratones neonatos que presentan cierta analgesia (latencias T1 más altas) podrían también considerar la situación menos estresante y realizar la respuesta de huida más rápido.

Contrario a los resultados obtenidos para los animales tratados, tanto los mutantes homocigotos EAR2 adultos como los neonatos tardaron más en escapar de la placa caliente que los ratones silvestres. Esto se podría explicar como una mayor ansiedad producida por la prueba, que les impidió reaccionar, en el caso de los ratones adultos, que presentaban mayor sensibilidad al dolor. Para los animales neonatos, que tardaron más en sentir el dolor, su latencia de huida fue también mayor. Los ratones mutantes heterocigotos EAR2 adultos actuaron con una latencia similar a los mutantes homocigotos, con unos tiempos de huida mayores que los animales silvestres. Sin embargo, en las pruebas neonatales, estos ratones heterocigotos EAR2 se comportaron como los animales silvestres, escapando de la placa caliente antes que los mutantes



homocigotos. Por lo que se corrobora así la diferencia en el sistema noradrenérgico de los ratones neonatos y los adultos.

Además de las diferencias entre el sistema noradrenérgico según la edad del animal, se suma también que en el grupo de los neonatos no se hizo diferencias entre sexos. La prueba de la placa caliente de los animales neonatos se realizó a ratones de ambos sexos, mientras que en adultos sólo se realizó para el sexo masculino. En los estudios realizados por Sternberg y cols. (2004), se ha observado que existe diferencia entre sexos para la nocicepción, incluso en la primera semana de vida. Así, los sujetos hembras recién nacidos tienen una latencia mayor de permanencia en la placa caliente que los animales machos. Por lo que en nuestro estudio, al no controlarse el número de animales de cada sexo, se podría haber dado una mayoría de hembras frente a los machos, alterando los resultados obtenidos.



## ***6. CONCLUSIONES***



La presente Tesis Doctoral se ha centrado en la función del sistema noradrenérgico y el papel del Locus coeruleus en el control del desarrollo postnatal, del sistema respiratorio, de la actividad exploratoria, del aprendizaje y la memoria y en la analgesia. De este estudio podemos obtener las siguientes **Conclusiones**:

1. La disminución de la liberación de noradrenalina, por el bloqueo de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  disminuye la frecuencia respiratoria pero no afecta a la respiración del animal pues éste compensa aumentando el  $V_t$ . No obstante, aparecen alteraciones en el funcionamiento del sistema respiratorio neonatal, caracterizado por la aparición de episodios de respiración episódica (HEB).
2. La eliminación de las neuronas dorsolaterales del Locus coeruleus en el mutante EAR2 no afecta a la frecuencia respiratoria, lo que demuestra que las neuronas restantes son las encargadas de controlar dicho parámetro respiratorio. La aparición de episodios de respiración episódica (HEB) demuestra que las neuronas ausentes son las encargadas de controlar dichos reflejos respiratorios.
3. La noradrenalina es necesaria para el correcto desarrollo del sistema vestibular de los ratones neonatos, mostrando un retraso en la aparición de los distintos reflejos en aquellos animales con una disminución de esta catecolamina. Las neuronas en posición dorsolateral podrían ser las encargadas de ello.
4. En relación con las pruebas motoras, la administración de ácido retinoico provoca hiperactividad en los ratones neonatos. Mientras que el fármaco clonidina, un agonista  $\alpha_2$  adrenérgico, provoca hipoactividad. Esta disminución de la actividad no está relacionada con la disminución de noradrenalina, ya que los mutantes EAR2 neonatos no mostraron diferencias en la actividad con sus controles.
5. La reducción de noradrenalina en el Locus coeruleus y la administración embrionaria de ácido retinoico provocan una disminución de la atención y la memoria a corto plazo (1 hora) en los ratones neonatos.

6. La ausencia de las neuronas en posición dorsolateral en los mutantes EAR2 adultos provoca una deficiencia en el equilibrio y coordinación motora, además de la fuerza muscular.
7. La noradrenalina secretada por las neuronas del Locus coeruleus es necesaria para aprendizajes que implican la participación de la amígdala, es decir, para el aprendizaje emocional.
8. La disminución de las neuronas dorsolaterales del Locus coeruleus en el mutante homocigoto EAR2 adulto no afecta a la latencia de respuesta de sobresalto, sin embargo, sí disminuye la magnitud de ésta, y aumenta la inhibición por prepulso, lo que indica que el procesamiento posterior de la información sensorial que ocurre en estructuras troncoencefálicas y corticales está alterado.
9. La mutación homocigota EAR2 adulta imposibilita el reconocimiento de objetos a corto y largo plazo, mientras que la mutación heterocigota la impide a largo plazo únicamente.
10. Los animales mutantes homocigotos EAR2 adultos son incapaces de aprender la asociación contextual luz- disponibilidad de comida.
11. La mutación EAR2 afecta a la nocicepción de los ratones adultos.

## ***7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS***





- Adams, J. (1993). Structure-activity and dose-response relationships in the neural and behavioural teratogenesis of retinoids. *Neurotoxicol-Teratol.* 15, 193-202.
- Adams, L.M., Geyer, M.A. (1981). Effects of 6-hydroxydopamine lesions of locus coeruleus on startle in rats. *Psychopharmacology.* 73, 394-398.
- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., del Río, J., y Ramírez, M.J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 32, 256-266.
- Andrews, W.D., y Parnavelas, J.G. (2012). Noradrenergic receptor activation alters the migration and distribution of interneurons in the developing neocortex. *European Journal of Neuroscience.* 36, 2877-2878.
- Ansermino, M., Basu, R., Vandebek, C., y Montgomery, C. (2003). Nonopioid additives to local anesthetics for caudal blockade in children: a systematic review. *Pediatr. Anaesth.* 13, 561-573. Review.
- Aston-Jones, G., Iba, M., Clayton, E., y Rajkowski, J. (2007). *Brain Norepinephrine: Neurobiology and therapeutics.* Cambridge University Press.
- Aston-Jones, G., Rajkowski, J., y Cohen, J. (1999). Role of locus coeruleus in attention and behavioral flexibility. *Biol psychiatry.* 46, 1309-1320.
- Aston-Jones, G., y Bloom, F.E. (1981). Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neuroscience.* 1(8), 876-886.
- Baddeley, A. D. (1986). *Working Memory.* Oxford University Press.
- Baddeley, A.D., y Hitch, G. (1974). *Psychology of learning and motivation.* Oxford University Press.
- Balemans, M.C., Huibers, M.H, Eikelenboom, W.D, Kuipers, A.J., van Summeren, C.J., Pijpers, M.C.A, Tachibana, M., Shinkai, Y., van Bokhoven, H., y van der Zee, E.E.M. (2010). Reduced exploration, increased anxiety, and altered social behavior: autistic-like features of euchromatin histone methyltransferase 1 heterozygous knockout mice. *Behavioural Brain Research.* 208, 47-55.

- Bari, A., y Aston-Jones, G. Atomoxetine modulates spontaneous and sensory-evoked discharge of locus coeruleus noradrenergic neurons. (2013). *Neuropharmacology*. 64, 53-64.
- Bean, B.P. (1989). Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* 340, 153–156. Brandt, S., Livingston, A., 1990. Receptor changes in the spinal cord of sheep associated with exposure to chronic pain. *Pain* 42, 323-329.
- Bear, M.F., y Singer, W. (1986). Modulation of visual cortical plasticity by acetylcholine and noradrenaline. *Nature*. 320, 172-176.
- Beato, M., Herrlich, P., y Schütz, G. (1995). Steroid hormone receptors: Many actors in search of a plot. *Cell*. 83, 851-857.
- Berridge, C.W., y Waterhouse, B.D. (2003). The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain research reviews*. 42, 33-84.
- Berridge, K. C., y Douglas, L. M. (2000). Reward learning: Reinforcement, incentives, and expectations. In *Psychology of Learning and Motivation*. 40, 223-278. San Diego, California: Academic Press.
- Bertram, G., Katzung. (2005). *Farmacología básica y clínica*. Manual Moderno.
- Bevins, R.A, y Besheer, J. (2006). Object recognition in rats and mice: a one trial non-matching-to-sample-learning task to study "recognition memory". *Nature Protocols*. 1, 3.
- Blue, M.E., y Parnavelas, J.G. (1982). The effect of neonatal 6-hydroxydopamine treatment on synaptogenesis in the visual cortex of the rat. *J. Comp. Neurol*. 205, 199-205.
- Bousquet, P., Feldman, J., y Schwartz, J. (1984). Central cardiovascular effects of alpha adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. *J Pharmacol Exp Ther*. 230, 232-6.
- Bousquet, P., Feldman, J., Tibirica, E., Bricca, G., Molines, A., Dontenwill, M., y Belcourt, A. (1989). New concepts on the central regulation of blood pressure. Alpha 2-adrenoceptors and "imidazoline receptors". *Am J Med*. 87, 10S-13S.

- Brandt, S.A., y Livingston, A. (1990). Receptor changes in the spinal cord of sheep associated with exposure to chronic pain. *Pain* 42, 323-329.
- Brown, G. R., Kadel, E.E., Bassoni, D.L., Kiehne, K.L., y Temesgen, B. (2001). Anchored reference loci in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) for integrating pine genomics. *Genetics*. 159, 799-809.
- Bruner, A. C. (2010). Conducta de comer: variables comunes a través del condicionamiento y la motivación. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, 36(2), 9-20.
- Bruno, K.J., y Hess, E.J. (2006). The  $\alpha_{2c}$ -adrenergic receptor mediates hyperactivity of *colomba* mice, a model of attention deficit hyperactivity disorder. *Neurobiology of disease*. 23, 679-688.
- Byrne, R. W. (1994). The evolution of intelligence. *Behavior and Evolution*, 33, 669-673.
- Cannon, M., Pelham, W.H., Sallee, F.R., Palumbo, D.R., Bukstein, O., Daviss, W.B., y the CAT Study Team. (2009). Effects of clonidine and methylphenidate on family quality of life in attention-deficit/ hyperactivity disorder. *Journal of child and adolescent psychopharmacology*. 19(5), 511-517.
- Chatonnet, F., Domínguez del Toro, E., Thoby-Brisson, M., Champagnat, J., Fortín, G., Rijli, F.M., y Thaëron-Antônio, C. (2003). From hindbrain segmentation to breathing after birth: developmental patterning in rhombomeres 3 and 4. *Mol Neurobiol*. 28(3), 277-94.
- Chatonnet, F., Domínguez del Toro, E., Voiculescu, O., Charnay, P., y Champagnat, J. (2002). Different respiratory control systems are affected in homozygous and heterozygous kreisler mutant mice. *Eur. J. Neurosci*. 15, 684-692.
- Cheung, T. H., y Cardinal, R. N. (2005). Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC Neurosci*, 6, 36.
- Chopin, P., Colpaert, F.C., y Marien, M. (2002). Effects of acute and subchronic administration of dexefaroxan, an  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist, on memory performance in young adult and aged rodents. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 301, 187-196.

- Clark, R.E., y Squire, L.R. (1998). Classical conditioning and brain systems: the role of awareness. *Science*. 280, 77-81.
- Clarke, J. R., Cammarota, M., Gruart, A., Izquierdo, I., y Delgado Garcia, J. M. (2010). Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(6), 2652-2657.
- Coberly, S., Lammer, E., y Alashari, M. (1996). Retinoic acid embryopathy: case report and review of literature. *Pediatr Pathol Lab Med*. 16(5), 823-36.
- Cold, G.E., y Dahl, B.L. (2003). *Neuroanestesia y cuidados neurointensivos*. Masson.
- Coombes, S., Revusky, S., y Tong Lett, B. (1980). Long-delay taste aversion learning in an unpoisoned rat: Exposure to a poisoned rat as the unconditioned stimulus. *Learning and Motivation*, 11(2), 256-266.
- Corbit, L. H., y Balleine, B. W. (2000). The role of the hippocampus in instrumental conditioning. *J Neurosci*, 20(11), 4233-4239.
- Cui, M., Feng, Y., McAdoo, D.J., y Willis, W.D. (1999). Periaqueductal gray stimulation-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats is associated with the release of norepinephrine, serotonin and amino acids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 868-876.
- Curtis, C. E., y Lee, D. (2010). Beyond working memory: the role of persistent activity in decision making. *Trends Cogn Sci*, 14(5), 216-222.
- Davis, E. R., y Platt, J. R. (1983). Contiguity and contingency in the acquisition and maintenance of an operant. *Learning and Motivation*, 14(4), 487-512.
- Delgado, J.M., Ferrús, A., Mora, F., y Rubia, F.J. (1998). *Manual de Neurociencia. Síntesis*.
- Deol, M.S. (1964). The abnormalities of the inner ear in kreisler mice. *J. Embryol Exp Morphol*. 12, 475-490.
- De Vos, H., Bricca, G., De Keyser, J., De Backer, J.P., Bousquet, P., y Vauquelin, G. (1994). Imidazoline receptors, non-adrenergic idazoxan binding sites and alpha 2-adrenoceptors in the human central nervous system. *Neuroscience*. 59(3), 589-98.

- Dierssen, M., Fotaki, V., Martínez de Lagrán, M., Gratacós, M., Arbonés, M., Fillat, C., y Estivill, X. (2002). Neurobehavioral development of two lines commonly used in transgenic studies. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 73, 19- 25.
- Domínguez-del-Toro, E., Borday, V., Davenne, M., Neun, R., Rijli, F., y Champagnat, J. (2001). Generation of a novel functional neuronal circuit in *Hoxa1* mutant mice. *J. of Neuroscience*. 21(15), 5637-42.
- Domjan, M. (2010). Instrumental Conditioning: Foundation. In *The Principles of Learning and Behavior: Active Learning Edition*, 6th Edition. Wadsworth Pub Co. Belmont, California.
- Dornelles, A., de Lima, M.N., Graziotin, M., Presti-Torres, J., Garcia, V.A., Scalco, F.S., Roesler, R., y Schröder, N. (2007). Adrenergic enhancement of consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*. 88, 137-42.
- Dygalo, N.N., Bannova, A.V., Kalinina, T.S., y Shishkina, G.T. (2004). Clonidine increases caspase-3 mRNA level and DNA fragmentation in the developing rats brainstem. *Brain Res Dev*. 152, 225-31.
- Dygalo, N.N., Iushkova, A.A., Kalinina, T.S., Surnina, N., Mel'nikova, L.B., y Shishkina, G.T. (2000). The ontogenetic correlations of noradrenaline level and adrenergic receptor density in the rat brain. *Ontogenez*. 31, 53-6.
- Eisenach, J.C., De Kock, M., y Klimscha, W. (1996).  $\alpha 2$ -adrenergic agonists for regional anesthesia. A clinical review of clonidine (1984–1995). *Anesthesiology* 85, 655–674.
- Engle, R. W. (2001). What is working memory capacity? In *The nature of remembering: Essays in honor of Robert G. Crowder* (pp. 297-314). J. S. N. H. L. Roediger III, I. Neath, y A. M. Surprenant (Ed.). Washington, DC: American Psychological Association.
- Engle, R. W. (2002). Working memory capacity as executive attention. *Current Directions in Psychological Science*, 11, 19-23.
- Engle, R. W., Tuholski, S. W., Laughlin, J. E., y Conway, A. R. (1999). Working memory, short-term memory, and general fluid intelligence: a latent-variable approach. *J Exp Psychol Gen*, 128(3), 309-331.

- Ennaceur, A., y Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res.* 31, 47-59.
- Erickson, J.T., Conover, J.C., Borday, V., Champagnat, J., y Katz, D.M. (1996). Mice lacking BDNF exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. *J. Neurosci.* 16, 5361-5371.
- Etchepareborda, M. C., y Abad Mas, L. (2005). Working memory in basic learning processes. *Rev Neurol*, 40 Suppl 1, S79-83.
- Fekete, D.M. (1999). Development of the vertebrate ear: insights from knockouts and mutants. *Trends Neurosci.* 22, 263-269.
- Flores-Cruz, G.M., y Escobar, A. (2012). Ontogenia de los sistemas de neurotransmisión. *Revista de Neurología.* 54(1), 41-48.
- Flórez, J. (1987). *Farmacología humana.* 4<sup>o</sup> Edición. Sistema Nervioso Central.
- Foote, S.L., Berridge, C.W., Adams, L.M., y Pineda, J.A. (1991). Electrophysiological evidence for the involvement of the locus coeruleus in alerting, orienting and attending. *Progress in Brain Research.* 88, 521-532.
- Fox, W.M. (1965). Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim Behav.* 13, 234-241.
- Fu, Y., Matta, S.G., McIntosh, J.M., y Sharp, B.M. (1999). Inhibition of nicotine-induced hippocampal norepinephrine release in rats by alpha- conotoxins MII and AulB microinjected into the locus coeruleus. *Neurosci. Lett.* 266, 113-116.
- Gall, A.J., Joshi, B., Best, J., Florang, V.R., Doorn, J.A., y Blumberg, M.S. (2009). Developmental emergence of power-law wake behavior depends upon the functional integrity of the locus coeruleus. *Sleep.* 32(7), 920-926.
- Gallardo-López, B. (2005). Niños hiperactivos (TDA-H). Causas. Identificación. Tratamiento. Una guía para educadores. Ediciones Ceac educación.
- Gardiner, D., Ndayibagira, A., Grün, F., y Blumberg, B. (2003). Deformed frogs and environmental retinoids. *Pure Appl. Chem.* 75(11-12), 2263-2273.
- Gavalas, A. (2002). ArRanging the hindbrain. *Trends Neurosci.* 25(2), 61-64.

- Gemmell, C., y O'Mara, S. M. (2000). Long-term potentiation and paired-pulse facilitation in the prelimbic cortex of the rat following stimulation in the contralateral hemisphere in vivo. *Exp Brain Res*, 132(2), 223-229.
- George, S.A., Knox, D., Curtis, A.L., Aldridge, J.W., Valentino, R.J., y Liberzon, I. (2012). Altered locus coeruleus-norepinephrine function following single prolonged stress. *European journal of Neuroscience*. 12095, 1-9.
- Gibbs, M.E. (2000). Summers RJ separate roles for  $\beta_2$  and  $\beta_3$ - adrenoceptors in memory consolidation. *Neuroscience*. 95, 913-922.
- Gilsbach, R., Roser, C, Beetz, N., Brede, M., Hadamek, K., Haubold, M., Leemhuis, J., Philipp, M., Schneider, J., Urbanski, M., Szabo, B., Weinshenker, D., y Hein, L. (2009) Genetic Dissection of  $\alpha_2$ -Adrenoceptor Functions in Adrenergic versus Nonadrenergic Cells. *Mol. Pharmacol*. 75:1160–1170.
- Goldman-Rakic, P. S. (1995). Cellular basis of working memory. *Neuron*, 14(3), 477-485.
- Goodman, A., Hardman, J.G., y Limbird, L.E. (1996). Las bases farmacológicas de la terapéutica. McGraw-Hill.
- Gorter, J., Kamphuis, W., Huisman, E., Bos, N., y Mirmiran, M. (1990) Neonatal clonidine treatment results in long-lasting changes in noradrenaline sensitive and kindling epileptogenesis. *Brain Research*. 535, 62-66.
- Gruart, A., Muñoz, M. D., y Delgado-Garcia, J. M. (2006). Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J Neurosci*, 26(4), 1077-1087.
- Guimarães, L., Domínguez-del-Toro, E., Chatonnet, F., Wrobel, L., Pujades, C., Monteiro, L.S., y Champagnat, J. (2007). Exposure to retinoic acid at the onset of hindbrain segmentation induces episodio breathing in mice. *European Journal of Neuroscience*. 25, 3526-3536.
- Gustafson, I., Westerberg, E., y Wieloch, T. (1990). Protection against ischemia-induced neuronal damage by the  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist idazoxan: influence of time of administration and possible mechanisms of action. *J Cereb Blood Flow Metab*. 10, 885-94.

- Gustafson, I., Miyauchi, Y., y Wieloch, T.W. (1989). Postischemic administration of idazoxan, an alpha-2 adrenergic receptor antagonist, decreases neuronal damage in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 9, 171-4.
- Han, F., Subramanian, S., Price, E.R., Nadeau, J., y Strohl, K.P. (2002). Periodic breathing in the mouse. *J. Appl. Physiol.* 92, 1133-1140.
- Handy, D.E., Flordellis, C.S., Bogdanova, N.N., Bresnahan, M.R., y Gavras, H. (1993). Diverse tissue expression of rat  $\alpha$ 2-adrenergic receptor genes. *Hypertension* 21, 861-865.
- Happe, H.K., Bylund, D.B., y Murrin, L.C. (1999). Alpha-2 adrenergic receptor functional coupling to G proteins in rat brain during postnatal development. *J Pharmacol Exp Ther.* 288, 1134-42.
- Happe, H.K., Coulter, C.L., Gerety, M.E., Sanders, J.D., O'Rourke, M., Bylund, D.B., y Murrin, L.C. (2004). Alpha-2 adrenergic receptor development in rat CNS: an autoradiographic study. *Neuroscience.* 123(1), 167-78.
- Hebb, D. O. (1949). *The organization of behavior: A neuropsychological theory.* New York, EE.UU.: John Wiley y Sons.
- Hernandez-Gonzalez. (2002). *Motivación animal y humana.* Guadalajara, Mexico: Editorial El Manual Moderno.
- Hernández-Triana, M., Porrata-Maury, C., y Jiménez-Acosta, S. (1998). Toxicidad de la vitamina A en el embarazo. *Resumed* 11(3), 153-60.
- Herrero, J.F., y Cerveró, F. (1996a). Supraspinal influences on the facilitation of rat nociceptive reflexes induced by carrageenan monoarthritis. *Neurosci. Lett.* 209, 21-24.
- Herrero, J.F., y Cerveró, F., (1996b). Changes in nociceptive reflex facilitation during carrageenan-induced arthritis. *Brain Res.* 717, 62-68.
- Herry, C., Vouimba, R. M., y Garcia, R. (1999). Plasticity in the mediodorsal thalamo-prefrontal cortical transmission in behaving mice. *J Neurophysiol*, 82(5), 2827-2832.
- Hertwig, P. (1944). Die Genese der Hirn-und Gehörorganmißbildungen bei rontgenmutierten Kreislermäusen. *Z. KonstLehre.* 28, 327-354.



- Heyser, C.J., Pelletier, M., y Ferris, J.S. (2004). The effects of methylphenidate on novel object exploration in weanling and periadolescent rats. *New York Academy of Sciences*. 1021, 465-469.
- Hilaire, G., Viemari, J.C., Coulon, P., Simonneau, M., Bévengut, M. (2004) Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. *Respiratory Physiology & Neurology*. 143, 187-197.
- Hoffman, H.S., e Ison, J.R. (1980). Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory inputs. *Psychological review*. 87(2), 175-189.
- Holson, R.R., Adams, J., y Ferguson, S.A. (1999) Gestational stage-specific effects of retinoic acid exposure in the rat. *Neurotoxicology and Teratology*. 21(4), 393-402.
- Hylden, J.L., Thomas, D.A., Iadarola, M.J., Nahin, R.L., y Dubner, R. (1991). Spinal opioid analgesic effects are enhanced in a model of unilateral inflammation/hyperalgesia: a possible involvement of noradrenergic mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 194, 135-143.
- Idänpään-Heikkilä, J.J., Kalso, E.A., y Seppälä, T. (1994). Antinociceptive actions of dexmedetomidine and the k-opioid agonist U-50488H against noxious thermal, mechanical and inflammatory stimuli. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271, 1306-1313.
- Iushkova, A.A., y Dygalo, N.N. (1995). Changes in the number of alpha 2- and beta-adrenoreceptors in the brain stem and cerebral cortex of rats in ontogeny. *Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 81, 7-11.
- Jacquin, T.D., Borday, V., Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Ghilini, G., Kato, F., Charnay, P., y Champagnat, J. (1996). Reorganization of pontine rhythmogenic neuronal networks in Krox-20 knockout mice. *Neuron* 17, 747-758.
- Jacob, F., y Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*. 3, 318-356.
- Jarrard, L. E. (1995). What does the hippocampus really do? *Behav Brain Res*, 71(1-2), 1-10.
- Jentsch, J.D., y Anzivino, L.A. (2004). A low dose of the alpha2 agonist clonidine ameliorates the visual attention and spatial working memory deficits produced by phencyclidine administration to rats *Psychopharmacology* 175, 76-83.

- Jones, BE. (2003) Arousal systems. *Front Biosci.* 8, 438-451.
- Jones, S.L. (1991). Descending noradrenergic influences on pain. *Prog Brain Res.* 88, 381-394. Review.
- Jones, S.L., y Gebbart, G.F. (1986). Quantitative characterization of coeruleospinal inhibition of nociceptive transmission in the rat. *J. Neurophysiol.* 56, 1937-1410.
- Jones, S.L., y Gebbart, G.F. (1986). Characterization of coeruleospinal inhibition of the nociceptive tail-flick reflex in the rat: mediation by spinal alpha-2 adrenoreceptors. *Brain Res.* 364, 315-330.
- Juhila, J., Haapalinna, A., Sirviö, J., Sallinen, J., Honkanen, A., Korpi, E.R., y Scheinin, M. (2003). The  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist atipamezole reduces the development and expression of D-amphetamine-induced behavioural sensitization. *Naunyn-Schemiedeberg's Arch Pharmacol.* 367, 274-280.
- Juhila, J., Honkanen, A., Sallinen, J., Haapalinna, A., Korpi, E.R., y Scheinin, M. (2005).  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptors regulate D-amphetamine-induced hyperactivity and behavioural sensitization in mice. *European Journal of Pharmacology.* 517, 74-83.
- Jurado-Parras, M. T., Gruart, A., y Delgado-Garcia, J. M. (2012). Observational learning in mice can be prevented by medial prefrontal cortex stimulation and enhanced by nucleus accumbens stimulation. *Learn Mem.* 19(3), 99-106.
- Jurado-Parras, M.T., Sánchez-Campusano, R., Castellanos, N.P., del-Pozo, F., Gruart, A., y Delgado, J.M. (2013). Differential contribution of hippocampal circuits to appetitive and consummatory behaviors during operant conditioning of behaving mice. *Journal Neuroscience.* 33(6), 2293-304.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., y Jessel, T. M. (2001). *Principios de neurociencia*: Mc Graw Hill Interamericana de España.
- Kastner, P., Mark, M., y Chambon, P. (1995). Nonsteroid nuclear receptors: What are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell.* 83, 859-869.
- Kiernan, J.A. (2005). *Barr's the human nervous system: an anatomical viewpoint*. Maryland, USA , Lippincott Williams & Wilkins.

- Kim, J.J., Lee, H.J., Han, J.S., y Packard, M.G. (2001). Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. *J. Neurosci.* 21, 5222-5228.
- Kreibich, A.S., Reyes, B.A.S., Curtis, A.L., Ecke, L., Chavkin, C., Van Bockstaele, E.J., y Valentino, R.J. (2008). Presynaptic inhibition of diverse afferents to the locus ceruleus by k-opiate receptors: a novel mechanism for regulating the central norepinephrine system. *The Journal of Neuroscience.* 28(25), 6516-6525.
- Kumandas, S, Akcokus, M, Coskum, A y Gumus, H. (2004). Joubert syndrome: review and report of seven new cases. *European. Journal. Neurologic.* 11:505-510.
- Laarakker, M.C., van Raai, J.R., van Lith, H.A., y Ohi, F. (2010). The role of the alpha 2A-adrenoceptor in mouse stress-coping behaviour. *Psychoneuroendocrinology.* 35, 490-502.
- Lakhiani, P.P., MacMillan, L.B., Guo T.Z., McCool B.A., Lovinger D.M, Maze M.,y Limbird L.E. (1997). Substitution of a mutant 2<sub>A</sub>-adrenergic receptor via "hit and run" gene targeting reveals the role of this subtype in sedative, analgesic, and anesthetic-sparing responses in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 9950-9955.
- Laudenbach, V., Mantz, J., Lagercrantz, H., Desmonts, J.M., Evrard, P., y Gressens, P. (2002). Effects of alpha(2)-adrenoceptor agonists on perinatal excitotoxic brain injury: comparison of clonidine and dexmedetomidine. *Anesthesiology.* 96(1), 134-41.
- LeBlanc-Duchin, D., y Taukulis, H.K. (2007). Chronic oral methylphenidate administration to periadolescent rats yields prolonged impairment of memory for objects. *Neurobiology of learning and memory.* 88, 312-320.
- LeWitt, P.A. (2012). Norepinephrine: the next therapeutics frontier for Parkinson's disease. *Translational Neurodegeneration.* 2012, 1-4.
- Lidow, M.S., y Rakic, P. (1994). Unique profiles of the alpha 1-, alpha 2-, and beta-adrenergic receptors in the developing cortical plate and transient embryonic zones of the rhesus monkey. *J. Neurosci.* 14, 4064-4078.
- Lindvall, O., y Stenevi, U. (1978). Dopamine and noradrenaline neurons projecting to the septal area in the rat. *Cell Tissue Res.* 190, 383-407.

- Lipscombe, D., Kongsamut, S., y Tsien, R.W. (1989).  $\alpha$ -adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium-channel gating. *Nature* 340, 639-642.
- López-Ramos, J.C., Tomioka, Y., Morimatsu, M., Yamamoto, S., Ozaki, K., Ono, E., y Delgado-García, J.M. (2010). Motor-coordination-dependent learning, more than others, is impaired in transgenic mice expressing pseudorabies virus immediate-early protein IE180. *Plos one*. 5(8), e12123.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J.C., Moro, MA., y Portolés, A. (2009). *Farmacología Básica y Clínica*. 18º Edición.
- Loughlin, S.E., Foote, S.L., y Bloom, F.E. (1986). Efferent projections of nucleus locus coeruleus: topographic organization of cells of origin demonstrated by three-dimensional reconstruction. *Neuroscience*.18, 291-306.
- Louvar, H., Maccari, S., y Darnaudéry, M. (2004). Prenatal stress affects behavioral reactivity to an intense stress in adult female rats. *Brain research*. 1031, 67-73.
- Lumsden, A., y Krumlauf, R. (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274, 1109-1115.
- McEwen, B., Chao, H., Spencer, R., Brinton, R., Macisaac, L., y Harrelson, A. (1987). Corticosteroid receptors in brain: relationship of receptors to effects in stress and aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 512, 394-401.
- MacDonald, E., y Scheinin, M. (1995). Distribution and pharmacology of  $\alpha$ 2-adrenoceptors in the central nervous system. *J Physiol Pharmacol.* 46, 241-258.
- Maden, M. (2002). Retinoic acid and limb regeneration: a personal view. *Int J Dev Biol.* 46(7), 883-6. Review.
- Madroñal, N., Delgado-García, J. M., Gruart, A. (2007). Differential effects of long-term potentiation evoked at the CA3 CA1 synapse before, during, and after the acquisition of classical eyeblink conditioning in behaving mice. *J Neurosci*, 45, 12139-12146.
- Maiese, K., Pek, L., Berge, S.B., y Reis, D.J. (1992). Reduction in focal cerebral ischemia by agents acting at imidazole receptors. *J Cereb Blood Flow Metab.* 12, 53-63.

- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., y Chambon, P. (1995). The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*. 83, 835-839.
- Manns, J.R., Clark, R.E., y Squire, L.R. (2000). Awareness predicts the magnitude of single-cue trace eyeblink conditioning. *Hippocampus*. 10, 181-186.
- Mansikka, H., y Pertovaara, A. (1995). Influence of selective  $\alpha$ 2-adrenergic agents on mustard oil-induced central hyperalgesia in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 281, 43-48.
- Mansouri, J., Panigrahy, A., Assmann, S.F.F., y Kinney, H.C. (2001). Distribution of  $\alpha$ 2-adrenergic receptor binding in the developing human brain stem. *Pediatr Dev Pathol.* 4(3), 222-2236.
- Manzanares, M., Trainor, P.A., Nonchev, S., Ariza-McNaughton, L., Brodie, J., Gould, A., Marshall, H., Morrison, A., Kwan, C., Sham, M., Wilkinson, D.G. and Krumlauf, R., (1999) The rôle of kreisler in segmentation during Hindbrain development. *Developmental Biology*. 211, 220-237.
- Manzanero, A.L. (2008). Aspectos básicos de la memoria. *Psicología del testimonio*. 27-45. Madrid. Ed. Pirámide.
- Maroun, M., y Richter-Levin, G. (2003). Exposure to acute stress blocks the induction of long-term potentiation of the amygdaloprefrontal cortex pathway in vivo. *J. Neurosci.* 23, 4406-4409.
- Mas-Nieto, M., Guen, S.L., Kieffer, B.L., Roques, B.P., y Noble, F. (2005). Physiological control of emotion-related behaviours by endogenous enkephalins involves essentially the delta opioid receptors. *Neuroscience*. 135(2), 305-13.
- Massé, F., Hascoët, M., Dailly, E., y Bourin, M. (2006). Effect of noradrenergic system on the anxiolytic-like effect of DOI (5-HT<sub>2A/2C</sub> agonists) in the four-plate test. *Psychopharmacology*. 183, 471-481.
- Maze, M., Scarfini, C., y Cavaliere, F. (2001). New agents for sedation in the intensive care unit. *Crit Care Clin.* 17, 881-897.
- Mehler, M.F. y Purpura, D.P. (2009). Autism, fever, epigenetics and the locus coeruleus. *Brain research reviews*. 59, 388-392.

- Mello-Carpes, P.B., e Izquierdo, I. (2013). The nucleus of the solitary tract --> nucleus paragigantocellularis --> locus coeruleus --> CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of learning and memory*. 100, 56-63.
- Mic, F.A., Molotkov, A., Benbrook, D.M., y Duester, G. (2003) Retinoid activation of retinoic acid receptor but not retinoid X receptor is sufficient to rescue lethal defect in retinoic acid synthesis. *P.N.A.S.* 100, 7135-7140.
- Miguelé, C., Fernández-Aedo, I., Torrecilla, M., Grandoso, L., Ugedo, L. (2009)  $\alpha 2$  Adrenoceptors mediate the acute inhibitory effect of fluoxetine on locus coeruleus noradrenergic neurons. *Neuropharmacology*. 56, 1068-1073.
- Mirmiran, M., Brenner, E., van der Gugten, J., y Swaab, D.F. (1985). Neurochemical and electrophysiological disturbances mediate developmental behavioral alterations produced by medicines. *Neurobehav Toxicol Teratol*. 6, 677-83.
- Mirmiran, M. y Swaab, D.F. (1987). Influence of drugs on brain neurotransmitters and behavioral states during development. *Dev. Pharmacol. Ther.* 10:377-84. Review.
- Moizeszowicz, J. (2000). *Psicofarmacología psicodinámica IV: estrategias terapéuticas y psiconeurobiológicas*. Buenos Aires: Paidós.
- Molina-Camacho, C.(2007). Implicación de la medetomidina y del ácido retinoico en la sensibilización nociceptiva. Interacción con anti-inflamatorios no esteroideos. Tesis doctoral. Universidad de Alcalá, Madrid.
- Mondaca, M., Hernández, A., Pérez, H., Villadares, L., Sierralta, W., Fernánadez, V., Soto-Moyano, R. (2004)  $\alpha 2$ -Adrenoceptor modulation of long-term potentiation elicited in vivo in rat occipital cortex. *Brain research*. 102(1), 292-296.
- Monod, J, y Jacob, F. (1961). Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 26, 389-401.
- Morgado-Bernal, I. (2005). *Psicobiología del aprendizaje y la memoria*. En CIC (Cuadernos de información y comunicación). Universidad autónoma de Barcelona.
- Morin-Surun, M.P., Boudinot, E., Sarraseca, H., Fortin, G. and Denavit-Saubié, M., (1992) Respiratory network remains functional in a mature guinea pig brainstem isolated. *Exp. Brain. Res.* 90, 375-383.

- Nieuwenhuys, R. (1985). Chemoarchitecture of the brain. Berlin, Springer- Verlag.
- Nogués, M.A., Benarroch, E. (2008) Abnormalities of respiratory control and the respiratory motor unit. *Neurologist*. 14, 273-88. Review.
- Oliveira, R.B., Howlett, M.C.H., Gravina, F.S., Imtiaz, M.S., Callister, R.J., Brichta, A.M., y Helden, D.F. (2010). Pacemaker currents in mouse locus coeruleus neurons. *Neuroscience*. 170, 166-177.
- Osterheld-Haas, M.C., Van der Loos, H., y Hornung, J.P. (1994). Monoaminergic afferents to cortex modulate structural plasticity in the barrelfield of the mouse. *Brain Res*. 77, 189-202.
- Pacak, K., Palkovits, M., Kopin, I.J., y Goldstein, D.S. (1995). Stressinduced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: in vivo microdialysis studies. *Front. Neuroendocrinol.* 16, 89-150.
- Parra-Hernández, E., Nava-Reyes, H., y Zamudio-Cortés, P. (2005). Ácido retinoico y función pulmonar. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (ISSN 0187-7585)*.
- Pascual-Leone, A., Grafman, J., y Hallet, M. (1994). Modulation of cortical motor output maps during development of implicit and explicit knowledge. *Science*. 263, 1287-1289.
- Pasqualetti, M., y Rijli, F.M. (2001). Vitamin A prevents inner ear defects in mice with congenital homeobox gene deficiency. *Scientific World Journal*. 1, 916-8.
- Pasqualetti, M., Neun, R., Davenne, M. y Rijli, F.M. (2001). Retinoic acid rescues inner ear defects in Hoxa1 deficient mice. *Nat. Genet*. 29, 34-39.
- Pasquier, D.A., y Reinoso-Suarez, F. (1978). The topographic organization of hypothalamic and brain stem projections to the hippocampus. *Brain Res. Bull*. 3, 373-389.
- Paxinos, G. (2012). The mouse nervous system. San Diego, California (EE.UU.): Academic Press.

- Peng, Y.B., Lin, Q., y Willis, W.D. (1996). Involvement of  $\alpha$ 2-adrenoceptors in the periaqueductal gray-induced inhibition of dorsal horn cell activity in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 125-135.
- Polaino-Lorente, A., y Ávila, C. (2000). *Cómo vivir con un niño/a hiperactivo/a. Comportamiento, diagnóstico, tratamiento, ayuda familiar y escolar.* Narcea, S.A. de ediciones Madrid.
- Polak P.E., Kalinin, S., y Feinstein, D.L. (2011). Locus coeruleus damage and noradrenaline reductions in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain.* 134, 665-677.
- Porrás-García, E., Cendelin, J., Domínguez-del-Toro, E., Vozeh, F., y Delgado-García, J.M. (2005). Purkinje cell loss affects differentially the execution, acquisition and prepulse inhibition of skeletal and facial motor responses in Lurcher mice. *Eur J Neurosci.* 21(4), 979-88.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., y Moore, P.K. (2003). *Farmacología.* Elsevier.
- Ren, K., y Dubner, R., 1996. Enhanced descending modulation of nociception in rats with persistent hindpaw inflammation. *J. Neurophysiol.* 76, 3025-3037.
- Rescorla, R.A., y Wagner, A.R. (1972). A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. Prokasy (Eds), *Classical conditioning II: Current research and theory.* 64-99.
- Roosendaal, B., Castello, N.A., Vedana, G., Barseganyan, A., y McGaugh, J.L. (2008). Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory.* 90, 576- 579.
- Rothman, K.J., Moore, L.L., Singer, M.R., Nguyen, U.S., Mannino, S., y Milunsky, A. (1995). Teratogenicity of high vitamin A intake. *N Engl J Med.* 333(21), 1369-1373.
- Ruiz-García, M, Gutiérrez-Moctezuma, J., Garza-Morales, S., de la Peña-Olvera, F. (2005). Trastorno por déficit de atención con hiperactividad. *Actualidades diagnósticas y terapéuticas. Academia Mexicana de Pediatría.* 62, 145-151.
- Ruiz-Vargas, J.M. (1980). *El estudio de la memoria. Tres Palacios. Psicología genetal II.* Madrid, UNED.



- Samuels, E.R., y Szabadi, E. (2008). Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part I: principles of functional organisation. *Current Neuropharmacology*. 6, 235-253.
- Samuels, E.R., y Szabadi, E. (2008). Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part II: physiological and pharmacological manipulations and pathological alterations of locus coeruleus activity in humans. *Current Neuropharmacology*. 6, 254-285.
- Santiago, J., Tornay, F., Gómez, E., y Elosúa, M.R. (2006). *Procesos psicológicos básicos*. Ed. Mc Graw-Hill (2ª edición).
- Saunders, C., y Limbird, L.E. (1999). Localization and trafficking of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes in cells and tissues. *Pharmacol Ther*. 84,193-205.
- Schank, J.R., Liles, L.C., y Weinshenker, D. (2008). Norepinephrine signaling through  $\beta$ -adrenergic receptors is critical for expression of cocaine- induced anxiety. *Biol Psychiatry*. 63(11), 1007-1012.
- Schuell, T.J. (1986). Cognitive conceptions of learning. *Review of Educational Research*, 56, 411-436.
- Schunk, D.H. (1997). *Teorías del aprendizaje*. Pearson Educación.
- Serrano-Atero, M.S., Peramo, F., Cañas, A., García-Saura, P., Serrano-Álvarez, C., y Caballero, J. (2002). Modulación descendente de la información nociceptiva (I). *Rev. Soc. Esp. Dolor*. 9, 382-390.
- Shishkina, G.T., Kalinina, T.S., Popova, N.K., y Dygalo, N.N. (2004). Influence of neonatal short-term reduction in brainstem  $\alpha_2A$ -adrenergic receptors on receptor ontogenesis, acoustic startle reflex, and prepulse inhibition in rats. *Behav Neurosci*. 118, 1285-92.
- Shishkina, G.T., Kalinina, T.S., Masnavieva, L.B., y Dygalo, N.N. (2003). Cortical  $\alpha_2a$  adrenoreceptors involved in the inhibitory control of motor activity in neonatal rats. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*. 53, 637-40.
- Shishkina, G.T., Kalinina, T.S., Sournina, N.Y., Saharov, D.G., Kobzev, V.F., y Dygalo, N.N. (2002). Effects of antisense oligodeoxynucleotide to the  $\alpha_2A$ -adrenoceptors on the plasma corticosterone level and on elevated plus-maze behavior in rats.. *Psychoneuroendocrinology*. 27, 593-601.

- Shishkina, G.T., Kalinina, T.S., Sournina, N.Y., y Dygalo, N.N. (2001). Effects of antisense to the ( $\alpha$ ) 2A-adrenoceptors administered into the region of the locus ceruleus on behaviors in plus-maze and sexual behavior tests in sham-operated and castrated male rats. *J Neurosci.* 21, 726-731.
- Simoni, R.F., Cangiani, L.M., Arantes-Pereira, A.M.S., Abreu, M.P., Cangiani, L.H., y Zemi, G. (2009). Efficacy of intraoperative methadone and clonidine in pain control in the immediate postoperative period after the use of remifentanyl. *Revista Brasileira de anestesiologia.* 59(4), 421-430.
- Sirbu, I.O., Gresh, L., Barra, J., y Duester, G. (2005). Shifting boundaries of retinoic acid activity control hindbrain segmental gene expression. *Development.* 132, 2611-2622.
- Sirviö, J., Harju, M., Riekkinen, P.Jr., Haapalinna, y A., Riekkinen P.J. (1992). Comparative effects of  $\alpha$ -2 receptor agents and THA on the performance of adult and aged rats in the delayed non-matching to position task. *Psychopharmacology (Berl).* 109(1-2), 127-33.
- Slater, P.J.B., Rosenblatt, J.S., Snowden, C.T., y Roper, T.J. (2002). *Advances in the study of behavior.* Academy Press.
- Small, K.M., y Liggett, S.B. (2001). Identification and functional characterization of  $\alpha$ 2-adrenoceptor polymorphisms. *Trends in Pharmacological Sciences* 22, 471-477.
- Soto-Moyano, R., Hernandez, A., Perez, H., Ruiz, S., Galleguillos, X., Belmar, J. (1989). Effect of clonidine early in life on brain morphofunctional deficits induced by neonatal malnutrition in the rat. *Int J Neurosci.* 49(1-2), 103-113.
- Stanfa, L.C., y Dickenson, A.H. (1994). Enhanced  $\alpha$ 2-adrenergic controls and spinal morphine potency in inflammation. *NeuroReport* 5, 469-472.
- Starke, K., y Altmann, K.P. (1973). Inhibition of adrenergic neurotransmission by clonidine: an action on prejunctional  $\alpha$ -receptors. *Postnatal Growth and Behavioral. Neuropharmacology.* 12, 339-347.
- Starke, R.A.R, y Melzack, R. (1988). Different  $\alpha$ -receptor subtypes are involved in clonidine produced analgesia in different pain tests. *Life Sciences.* 44, 9-17.

- Sternberg, W.F., Smith, L., y Scorr, L. (2004). Nociception and antinociception during the first week of life in mice: Sex differences and test dependence. *The journal of pain*. 5(8), 420-426.
- Suarez, O.A.X., y Hoshino, K. (2008). Compensatory rebound of body movements during sleep, after asphyxia in neonatal rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 23(3), 253-257.
- Suengas, A. (1991): El origen de los recuerdos. En J.M. Ruiz-Vargas (Comp.): *Psicología de la memoria*. Madrid: Alianza.
- Sullivan, R.M., Wilson, D.A., Lemon, C., y Gerhardt, G.A. (1994). Bilateral 6-OHDA lesions of the LC impair associative olfactory learning in newborn rats. *Brain Res*. 643, 306-309.
- Szadabi, E. (2012). Modulation of physiological reflexes by pain: role of the locus coeruleus. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 6(94), 1-14.
- Takahashi, K., Kayama, Y., Lin, J.S., y Sakai, K. (2010). Locus coeruleus neuronal activity during the sleep-waking cycle in mice. *Neuroscience*. 169, 1115-1126.
- Takano, M., Takano, Y., y Yaksh, T.L. (1993). Release of calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P (SP), and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) from rat spinal cord: modulation by  $\alpha 2$ -agonists. *Peptides* 14, 371-378.
- Takeuchi, T., Kiyama, Y., Nakamura, K., Tsujita, M., Matsuda, I., Mori, H., Munemoto, Y., Kuriyama, H., Natsume, R., Sakimura, K., y Mishina, M. (2001). Roles of the glutamate receptor epsilon 2 and delta 2 subunits in the potentiation and prepulse inhibition of the acoustic startle reflex. *The European journal of Neuroscience*. 14(1), 153-160.
- Tamashiro, K.L.K., Wakayama, T., Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., y Yanagimachi, R. (2000). Postnatal growth and behavioral development of mice cloned from adult cumulus cells. *Biol. of Reprod*. 63, 328–334.
- Tasker, R.A.R., y Melzack, R. (1988). Different alpha-receptor subtypes are involved in clonidine produced analgesia in different pain tests. *Life Sciences*. 44, 9-17.
- Thomas, A.J., Erokwu, B.O., Yamamoto, B.K., Ernsberger, P., Bishara, O., y Strohl, K.P. (2000). Alterations in respiratory behavior, brain neurochemistry and receptor density induced by pharmacologic suppression of sleep in the neonatal period. *Developmental Brain Research*. 120, 181-189.

- Thorndike, E. L. (1898). Animal intelligence: An experimental study of the associate processes in animals. Psychological Review Monograph, 2.
- Thorndike, E. L. (1911). Animal intelligence: experimental studies. New York (EE.UU): Mcmillan ed.
- Thorpe, W. H. (1963). Learning and instinct in animals Cambridge, MA (EE.UU.): Harvard University Press ed.
- Thummel, C.S. 1995. From embryogenesis to metamorphosis: The regulation and function of Drosophila nuclear receptor superfamily members. Cell. 83, 871-877.
- Tibiriça, E., Feldman, J., Mermet, C., Gonon, F., y Bousquet, P. (1991). An imidazoline-specific mechanism for the hypotensive effect of clonidine: a study with yohimbine and idazoxan. J Pharmacol Exp Ther. 256, 606-13.
- Tomasello, M., Kruger, A.C., y Ratner, H.H. (1993). Cultural learning. Behav Brain Sci. 16, 495-552.
- Topor, Z.L., Vasilakos, K., Younes, M., y Remmers, J.E. (2007) Model based analysis of sleep disordered breathing in congestive heart failure. Respir. Physiol. Neurobiol. 155, 82-92.
- Torterolo, P., Vanini, G. (2010) Nuevos conceptos sobre la generación y el mantenimiento de la vigilia. Rev Neurol. 50, 747-758.
- Tsuruoka, M., Tamaki, J., Maeda, M., y Hayashi, B. (2010). The nucleus locus coeruleus/subcoeruleus affects the defensive-like, immobile posture following an air-puff startle reaction in the rat. Neuroscience. 168, 149-155.
- Ungerstedt, U. (1971). Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. Acta Physiol. Scand. Suppl. 367, 1-49.
- Valentino, R.J., Curtis, A.L. (1991). Antidepressant interactions with corticotropin-releasing factor in the noradrenergic nucleus locus coeruleus. Psychopharmacol Bull. 27, 263-269.
- Valenzuela-Harrington, M., Negrete-Díaz, V., y Rodríguez-Moreno, A. (2007). Núcleo coeruleus. Neurotransmisores, funciones y patología. Anestesia en México. 19(3), 155-166.

- Vaquerizo-Madrid, J., Estévez-Díaz, F., y Pozo-García, A. (2005). El lenguaje en el trastorno por déficit de atención con hiperactividad: competencias narrativas. *Revista de Neurología*. 41, S83-S89.
- Varty, G.B., Paulus, M.P., Braff, D.L., y Geyer, M.A. (2000). Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: effects on locomotor behaviour and startle response plasticity. *Biol Psychiatry*. 47, 864-873.
- Velley, L., Cardo, B., Kempf, E., Mormede, P., Nassif-Caudarella, S., y Velly, J. (1991). Facilitation of learning consecutive to electrical stimulation of the locus coeruleus: cognitive alteration or stress-reduction? *Prog Brain Res*. 88, 555-69.
- Vidarte, J.A., Ezquerro, M., y Giráldez, M.A. (2009). Perfil psicomotor de niños de 5 a 12 años diagnosticados clínicamente de trastorno por déficit de atención/hiperactividad en Colombia. *Revista de neurología*. 49(2), 69-75.
- Viemari, J.C., Bévengut, M., Burnet, H., Coulon, P., Pequignot, J.M., Tiveron, M.C., y Hilaire, G. (2004). Phox2a gene, A6 neurons, and noradrenaline are essential for development of normal respiratory rhythm in mice. *The Journal of Neuroscience*. 24(4), 928-937.
- Viemari, J.C., Maussion, G., Bévengut, M., Burnet, H., Pequignot, J.M., Népote, V., Pachnis, V., Simonneau, M., y Hilaire, G. (2005). Ret deficiency in mice impairs the development of A5 and A6 neurons and the functional maturation of the respiratory rhythm. *European Journal Neuroscience*. 22(10), 2403-2412.
- Viemari, J.C., Garcia III, A.J., Doi, A., y Ramirez, J.M. (2011). Activation of alpha-2 noradrenergic receptors is critical for the generation of fictive eupnea and fictive gasping inspiratory activities in mammals in vitro. *European Journal Neuroscience*. 33, 2228-2237.
- Viltart, O., Mairesse, J., Darnaudéry, M., Louvart, H., Vanbesien, Mailliot, C., Catalani, A., y Maccari, S. (2006). Prenatal stress alters Fos protein expression in hippocampus and locus coeruleus stress-related brain structures. *Psychoneuroendocrinology*. 31, 769-780.
- Von Holst, D. (1998). The concept of stress and its relevance for animal behavior. *Adv Study Behav*. 27, 1-131.

- Wang, F., y Lidow, M.S. (1997). Alpha 2A-adrenergic receptors are expressed by diverse cell types in the fetal primate cerebral wall. *J. Comp. Neurol.* 378, 493-507.
- Wang, Y., Zhang, Q.J., Liu, J., Ali, U., Gui, Z.H., Hui, Y.P., Wang, T., Chen, L., y Li, Q. (2010). Noradrenergic lesion of the locus coeruleus increases the firing activity of the medial prefrontal cortex pyramidal neurons and the role of  $\alpha_2$ -adrenoceptors in normal and medial forebrain bundle lesioned rats. *Brain research.* 1324, 64-74.
- Warnecke, M., Oster, H., Revelli, J.P., Alvarez-Bolado, G., y Eichele, G. (2005). Abnormal development of the locus coeruleus in Ear2 (Nr2f6)-deficient mice impairs the functionality of the forebrain clock and affects nociception. *Genes and development.* 19, 614-625.
- Watson, C., Paxinos, G., Puelles, L. (2012). The mouse nervous system. Londres, GRB: Academic Press.
- Weil-Fugazza, J., Godefroy, F., Manceau, V., y Besson, J.M. (1986). Increased norepinephrine and uric acid levels in the spinal cord of arthritic rats. *Brain Res.* 374, 190-194.
- White, R.J., y Schilling T.F. (2008). How degrading: Cyp26s in hindbrain development. *Developmental dynamics* 237, 2775-2790.
- Wikberg, J.E., y Uhlén, S. (1990). Further characterization of the guinea pig cerebral cortex idazoxan receptor: solubilization, distinction from the imidazole site, and demonstration of cirazoline as an idazoxan receptor-selective drug. *J Neurochem.* 55, 192-203.
- Wilens, T.E., y Spencer T.J. (2000). The stimulants revisited. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.* 9(3), 573-603.
- Williams, J.T., Henderson, G., y North, R.A. (1985). Characterization of  $\alpha_2$ -adrenoceptors which increase potassium conductance in rat locus coeruleus neurons. *Neuroscience* 14, 95-101.
- Willis, W.D., Westlund, K.N., y Carlton, S.M. (2004). Pain system. In *The rat nervous system* (ed. G. Paxinos). 853-890. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Winzer-Serhan, U.H., Raymon, H.K., Broide, R.S., Chen, Y. y Leslie, F.M. (1997). Expression of  $\alpha_2$  adrenoreceptors during rat brain development-I.  $\alpha_2A$  messenger RNA expression. *Neuroscience.* 76(1), 241-260.

- Wood, H., Pall, G., y Morriss-Kay, G. (1994). Exposure to retinoic acid before or after the onset of somitogenesis reveals separate effects on rhombomeric segmentation and 3' HoxB gene expression domains. *Development*. 120, 2279-2285.
- Xue-bing, L., Shi, J., Heng, S., Jing, X., Wen-ting, Z., Li, F., Guo-hao, W., y Jing, F. (2011). The orphan nuclear receptor EAR2 is overexpressed in colorectal cancer and it regulates survivability of colon cancer cells. *Cancer letters*. 309, 137-144.
- Yamamoto, M., Zhang, J., Smith, D., Hayakawa, Y., y McCaffery, P. (2003). A critical period for retinoic acid teratogenesis and loss of neurophilic migration of pontine nuclei neurons. *Mech. Dev.* 120, 701-709.
- Yamamoto, M., Fujinuma, M., Hirano, S., Hayakawa, Y., Clagett-Dame, M., Zhang, J., y McCaffery, P. (2005). Retinoic acid influences the development of the inferior olivary nucleus in the rodent. *Dev. Biol.* 280, 421-433.
- Yela-Bernabé, J. R., y Gómez-Martínez M. A. (2006). Principios y aplicaciones del condicionamiento y aprendizaje. Salamanca (España): Universidad pontificia Salamanca.

